

**PENGARUH TERAPI SALEP EKSTRAK DAUN SINGKONG
(*Manihot esculenta*) TERHADAP PENURUNAN KADAR
MALONDIALDEHYDE (MDA) DAN HISTOPATOLOGI
KOLAGEN KULIT TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus
norvegicus*) DENGAN LUKA BAKAR DERAJAT II**

SKRIPSI

Oleh:
DUWI FATMAWATI
135130101111015



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka bakar merupakan cedera atau trauma jaringan yang dapat disebabkan panas kering (api), kimiawi, bahan elektrik (arus listrik), panas lembab (uap atau cairan panas) dan radian (Hatta dkk., 2015). Menurut Arifin (2012), selain menyebabkan kerusakan pada kulit, luka bakar dapat pula mempengaruhi jaringan yang lebih dalam seperti otot, tulang dan pembuluh darah. Luka bakar yang menyebabkan kegagalan dua organ atau lebih memiliki tingkat mortalitas yang tinggi yaitu sebesar 98%, sedangkan tingkat mortalitas 75% disebabkan oleh infeksi pada luka bakar tersebut. Menurut Rosiana (2013), mortalitas kejadian luka bakar dapat dihubungkan dengan derajat kedalaman jaringan yang rusak. Derajat luka bakar diklasifikasikan menjadi derajat I, II, dan III, dimana pada derajat III terjadi kerusakan seluruh jaringan kulit hingga berwarna hitam, selain itu terjadi pula kerusakan hingga tulang. Tingkat morbiditas luka bakar dapat dikaitkan dengan luas area kulit yang terkena. Beratnya luka bakar dapat dikategorikan menjadi 3, yaitu ringan, sedang dan berat. Luka bakar berat merupakan luka bakar derajat II seluas >20% atau derajat III seluas >10%.

Kejadian luka bakar sering terjadi pada hewan yang hidup dekat dengan manusia, seperti hewan ternak dan hewan peliharaan. Berdasarkan laporan yang dituliskan oleh Morwal (2016), pada bulan Januari 2014 di desa Udawaas, negara bagian Rajasthan, India telah terjadi kasus luka bakar pada 6 ekor banteng dan 8

ekor sapi akibat kebakaran dan hewan dalam keadaan diikat. Berdasarkan Dahlqvist *et al* (2009), telah dilaporkan kejadian luka bakar pada anjing spaniel berumur 9 bulan akibat terkena air panas. Kejadian luka bakar dapat pula terjadi pada hewan liar, seperti laporan 14 orangutan yang diselamatkan dari kebakaran hutan di kalimantan barat (BBC Indonesia, 2015).

Penanganan pertama yang dilakukan saat terjadi luka bakar sangat penting untuk dilakukan. Pemanfaatan bahan yang mudah didapatkan dapat menjadi pilihan dalam penanganan luka bakar, khususnya pada daerah terpencil. Daun singkong (*Manihot esculenta*) merupakan bahan yang mudah didapatkan di Indonesia. Menurut Rosiana, dkk. (2013), daun singkong mengandung flavonoid, saponin, vitamin C, dan vitamin A. Flavonoid memiliki efek sebagai anti-inflamasi dan anti-oksidan. Menurut Kumar and Pandey (2013), flavonoid dapat menghambat enzim yang membantu pembentukan radikal bebas, meningkatkan proteksi antioksidan serta melindungi lipid agar tidak mengalami kerusakan akibat stress oksidatif, dalam hal ini akibat luka bakar, sehingga mencegah terjadinya radikal bebas. Saponin yang terkandung dalam daun singkong berperan terhadap proses epitelisasi dengan meningkatkan fibronectin, selain itu saponin terbukti pula dapat meningkatkan pembentukan pembuluh darah. Menurut Astuti (2011), saponin dapat menstimulus pembentukan kolagen yang memiliki peran dalam proses penyembuhan luka. Vitamin C memiliki peran sebagai antioksidan yang membantu mencecah radikal bebas, meningkatkan kerja sistem imun, mencegah kanker serta berfungsi sebagai kofaktor hidrosilasi prolin dalam pembentukan kolagen, sedangkan vitamin A berperan pada diferensiasi dan pergantian sel yang penting

dalam proses penyembuhan luka. Menurut Nisa (2013), daun singkong mengandung triterpenoid dan tanin. Triterpenoid merupakan senyawa antivirus, antibakteri serta menginduksi penyembuhan pada kulit. Menurut Negara (2014), senyawa tanin berfungsi untuk meningkatkan jumlah pembentukan pembuluh darah kapiler dan sel fibroblast.

Kandungan yang terdapat dalam daun singkong dapat membantu proses kesembuhan luka bakar. Flavonoid dan vitamin C yang membantu untuk mencegah terjadinya stress oksidatif dengan menyumbangkan antioksidan, selain itu dapat pula memicu peningkatan jumlah sel imun yang dibutuhkan. Hal ini dapat membantu untuk menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) yang merupakan produk hasil peroksidasi lipid yang bersifat sitotoksik. Triterpenoid yang berperan sebagai antibakteri yang mencegah infeksi sekunder pada luka bakar. Saponin dan tanin pada daun singkong berperan dalam pembentukan fibroblast, kolagen serta memicu pembentukan pembuluh darah baru, yang dibutuhkan pada fase proliferasi dari proses kesembuhan luka.

Luka bakar akan memicu stress oksidatif akibat adanya ketidakseimbangan antara oksidan dan anti-oksidan yang dapat merusak sel. Radikal bebas dapat meningkatkan peroksidasi lipid yang kemudian akan terdekomposisi menjadi *malondialdehyde* (MDA) dalam darah. Profil MDA pada serum, plasma dan urin dapat menjadi parameter kerusakan seluler akibat radikal bebas. Stress oksidatif dapat dicegah oleh anti-oksidan dengan menyumbangkan satu atau lebih elektron yang akan menstabilkan radikal bebas. Anti-oksidan alami dapat ditemukan dalam

tanaman berupa senyawa flavonoid, fenol, dan keratenoid (Latifa, 2015). Pemeriksaan kadar MDA dapat pula dilakukan pada jaringan (Yustika, dkk. 2013).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keefektifan salep ekstrak daun singkong dalam membantu proses penyembuhan luka bakar yang dilihat dari perubahan gambaran histopatologi kolagen serta menurunnya kadar *malondialdehyde* (MDA).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan pemaparan mengenai latar belakang dilakukannya penelitian ini, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut :

1. Apakah salep ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dapat digunakan untuk terapi luka bakar pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang dilihat dari menurunnya kadar *malondialdehyde* (MDA)?
2. Apakah salep ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dapat digunakan untuk terapi luka bakar pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang dilihat dari gambaran kolagen kulit punggung?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dengan usia 8-12 minggu (Isrofah, 2015) dan berat 150-200 gram (Negara, dkk.2014).

2. Luka bakar pada tikus dilakukan pada area kulit punggung yang terlebih dahulu didisinfeksi dengan alkohol dan dibiarkan hingga kering, kemudian tikus dianestesi dengan kombinasi ketamin dan *xylazine*. Luka bakar dibuat dengan menggunakan solder listrik yang dimodifikasi dengan stainless steel berukuran 2x2 cm. Solder dipanaskan selama 5 menit dan ditempelkan pada kulit selama 5 detik (Balqis dkk., 2014).
3. Luka bakar derajat II merupakan luka bakar yang terjadi hingga lapisan dermis kulit, baik sebagian dermis ataupun seluruhnya, yang ditandai dengan terbentuknya bula dan berwarna pucat kemerahan (AlQahtani *et al*, 2014).
4. Daun singkong yang digunakan adalah daun singkong segar yang berada di bagian tengah pohon (daun ke 4-7 dari pucuk) kemudian dipotong kecil, diangin-anginkan, dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40-60°C selama ± 1 hari, selanjutnya di *blender* menjadi serbuk (Meiliana dkk, 2014 dan Dewi, 2014).
5. Proses ekstraksi daun singkong dilakukan dengan maserasi etanol 95% selama 3 hari dengan pergantian pelarut setiap 24 jam sekali hingga diperoleh ekstrak cair, kemudian disaring dan filtratnya dipekatkan pada suhu 40°C selanjutnya di *waterbath* pada suhu 70°C untuk memperoleh ekstrak kental (Mutia,dkk. 2016).
6. Pembuatan salep ekstrak daun singkong dibuat dengan mencampurkan ekstrak daun singkong dalam konsentrasi masing-masing 4%, 8% dan 12%

- ke dalam dasar salep yang dibuat sediaan total sebanyak 20 gram, salep diberikan dua kali sehari dengan banyak salep sekali pemberian $\pm 0,1$ gram.
7. Terapi pemberian salep daun singkong diberikan pada hewan coba langsung setelah dilakukan perlakuan dan dilanjutkan selama 14 hari pada tiap kelompok terapi dengan masing-masing konsentrasi yang telah ditentukan (Khazaeli *et al*, 2014).
 8. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar *Malondialdehyde* (MDA) dengan metode spektrofotometer (Latifa, 2015).
 9. Gambaran histopatologi kolagen pada kulit dengan pewarnaan Mallory perbesaran 40x (Balqis dkk., 2014).

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui apakah salep ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi luka bakar.
2. Mengetahui apakah salep ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dapat meningkatkan gambaran kolagen pada kulit punggung tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi luka bakar.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi terkait pemanfaatan daun singkong sebagai bahan terapi luka bakar.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Luka Bakar

2.1.1 Pengertian Luka Bakar

Menurut Moenadjat (2009) luka bakar adalah suatu bentuk kerusakan dan atau kehilangan jaringan disebabkan oleh kontak dengan sumber yang memiliki suhu yang sangat tinggi (misalnya api, air panas, bahan kimia, listrik dan radiasi) atau suhu yang sangat rendah. Dalamnya luka bakar bergantung pada suhu agen penyebab luka bakar dan lamanya kontak dengan agen tersebut.

2.1.2 Etiologi Luka Bakar

Menurut Rahayuningsih (2012), penyebab atau etiologi luka bakar dapat dikategorikan sebagai berikut:

1. Luka Bakar *Thermal*

Luka bakar *thermal* (panas) yang disebabkan oleh paparan atau kontak dengan api, cairan panas atau objek panas lainnya.

2. Luka Bakar *Chemical*

Luka bakar *chemical* (kimia) disebabkan oleh kontak jaringan kulit dengan asam atau basa kuat. Konsentrasi zat kimia, lamanya kontak dan banyaknya jaringan yang terpapar akan menentukan luasnya injuri. Contoh penyebab luka bakar kimia adalah zat-zat pembersih yang sering digunakan untuk keperluan rumah tangga dan berbagai zat kimia yang digunakan dalam bidang industri, pertanian dan militer.

3. Luka Bakar *Electric*

Luka bakar *electric* (listrik) disebabkan oleh panas yang digerakkan dari energi listrik yang dihantarkan melalui tubuh. Berat ringannya luka dipengaruhi oleh lamanya kontak, tingginya voltase dan cara gelombang elektrik itu sampai mengenai tubuh.

4. Luka Bakar *Radiation*

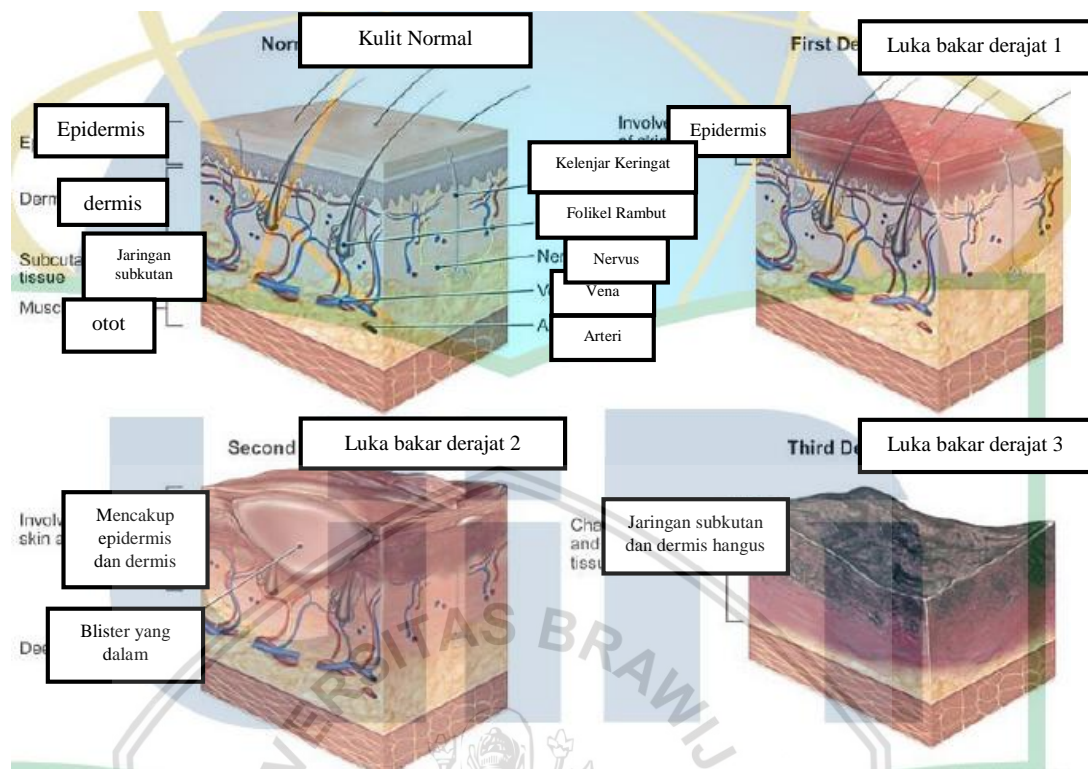
Luka bakar *radiation* (radiasi) disebabkan oleh paparan dengan sumber radioaktif. Tipe injuri ini seringkali berhubungan dengan penggunaan ion radiasi pada industri atau dari sumber radiasi untuk keperluan terapeutik pada dunia kedokteran, serta dapat pula disebabkan oleh paparan sinar matahari yang terlalu lama.

2.1.3 Klasifikasi Luka Bakar

Tingkat keparahan luka bakar berkenaan dengan lamanya waktu paparan, temperatur sumber panas dan ketebalan kulit. Berdasarkan kedalaman jaringan yang mengalami cedera, luka bakar dapat dibagi menjadi beberapa derajat yang dapat dilihat pada **Gambar 2.1** (AlQahtani *et al*, 2014; Yapa and Enoch, 2009):

1. Derajat I (*superficial*), hanya terjadi di permukaan kulit, pada seluruh epidermis. Manifestasinya berupa kulit tampak kemerahan, tidak ada bula serta tidak menimbulkan jaringan parut saat fase *remodelling*, terdapat nyeri yang ringan karena ujung-ujung saraf sensorik teriritasi. Penyembuhan luka bakar (regenerasi epitel) terjadi secara spontan dalam waktu 5-7 hari.

2. Derajat II (*superficial dermal*), melibatkan semua lapisan epidermis dan sebagian lapisan dermis, terdapat bula dan nyeri. Bila epidermis terlepas (terkelupas), terlihat dasar luka kemerahan-kadang pucat-*edematus*, dan eksudatif. Penyembuhan terjadi secara spontan, umumnya memerlukan waktu antara 10-14 hari. Derajat II (*deep dermal*), kerusakan terjadi pada semua lapisan epidermis dan dermis. Potensi regenerasi epidermis berasal dari lapisan epitelium bagian kulit lain. Terdapat bula, sensasi rasa nyeri ada atau dapat pula menghilang dan luka berwarna lebih kemerahan dari pada derajat II dangkal serta kering. Sering dijumpai eskar tipis di permukaan kulit. Penyembuhan memerlukan waktu lebih dari dua minggu.
3. Derajat III (*full thicknes*), nekrosis terjadi pada seluruh bagian epidermis dan dermis dengan potensi untuk regenerasi epitel yang kecil. Kulit tampak seperti arang akibat jaringan yang terbakar. Saraf sensoris mengalami kerusakan atau kematian sehingga penderita hilang sensasi dan tidak merasakan nyeri. Kerusakan terjadi di seluruh kulit, jaringan subkutan sampai tulang. Proses penyembuhan memerlukan waktu yang lama. Pembentukan jaringan granulasi dan jaringan parut terbesar merupakan ciri dari luka bakar derajat tiga. Kondisi ini dapat mengalami komplikasi akibat infeksi sekunder.



Gambar 2.1. Kedalaman luka bakar (AlQahtani *et al*, 2014)

Beratnya luka bakar berdasarkan derajat dan luasnya kulit yang terkena, dapat dikategorikan menjadi 3 yaitu ringan, sedang dan berat. Luka bakar ringan merupakan luka bakar derajat I seluas $<10\%$ atau derajat II seluas $<2\%$. Luka bakar sedang adalah luka bakar derajat I seluas $10-15\%$ atau derajat II seluas $5-10\%$. Luka bakar berat merupakan luka bakar derajat II seluas $>20\%$ atau derajat III seluas $>10\%$ atau akibat listrik tegangan tinggi ($>1000V$) (James, 1990).

2.2 Proses Penyembuhan Luka

Fase penyembuhan luka akibat kerusakan integritas kulit terbagi atas beberapa fase, yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi. Fase penyembuhan luka dapat terlihat pada **Tabel 2.1**.

1. Fase Inflamasi (*lag phase*)

Fase inflamasi dimulai segera setelah cedera sampai hari keempat hingga kelima pasca cedera. Tujuan utama fase ini adalah hemostasis, fagositosis jaringan yang mati dan pencegahan kolonisasi maupun infeksi oleh agen mikrobial patogen. Pembuluh darah yang cedera mengakibatkan termobilisasinya berbagai elemen darah ke lokasi luka. Agregasi platelet akan terbentuk pada pembuluh darah yang cedera. Selama proses ini berlangsung, platelet akan mengalami degranulasi dan melepaskan beberapa *growth factor*, seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor- β* (TGF- β). Hasil akhir fase ini adalah konversi fibrinogen menjadi fibrin (Gurtner. 2007).

Sel neutrofil akan menginfiltrasi matriks fibrin dan mengisi kavitas luka segera setelah terjadi luka. Migrasi neutrofil ke luka dapat pula disebabkan oleh karena peningkatan permeabilitas kapiler akibat terlepasnya serotonin dan histamin oleh sel mast. Neutrofil pada umumnya akan ditemukan pada dua hari pertama dan berperan penting untuk memfagositosis jaringan mati dan mencegah infeksi. Keberadaan neutrofil yang berkepanjangan merupakan penyebab utama terjadinya konversi dari luka akut menjadi luka kronis yang tak kunjung sembuh. Sekitar 48 jam setelah terjadi luka, monosit akan bermigrasi ke area luka. Hal ini disebabkan oleh adanya *growth factor*, sitokin dan kemokin yang berasal dari platelet serta neutrofil, yang merupakan kemoatraktan untuk monosit. Monosit pada area luka akan mengalami diferensiasi menjadi makrofag. Makrofag berperan dalam fagositosis jaringan mati yang disebabkan oleh luka bakar, menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) serta menginduksi migrasi serta proliferasi dari fibroblast.

Adanya peranan dari neutrofil dan makrofag pada fase inflamasi ini sesuai dengan yang tertera pada **Tabel 2.1** (Regan *and* Barbul, 1994; Gurtner, 2007; Rajan *and* Murray, 2008).

Fase ini disebut *lag phase* atau fase lamban karena reaksi pembentukan kolagen baru sedikit, belum ada *tensile strength* serta pertautan luka hanya dipertahankan oleh fibrin dan fibronectin (Regan *and* Barbul, 1994).

2. Fase Proliferasi

Fase proliferasi disebut pula fase fibroplasia dan berlangsung pada hari ke-4 hingga hari ke-21 pasca cedera. Matriks fibrin yang didominasi oleh platelet dan makrofag secara gradual digantikan oleh jaringan granulasi yang tersusun dari kumpulan fibroblas, makrofag dan sel endotel yang membentuk matriks ekstraseluler dan neovaskular. Makrofag akan melepaskan PDGF dan *epidermal growth factor* (EGF) yang kemudian memicu migrasi dan proliferasi dari fibroblast. Fibroblast berasal dari sel mesenkim yang belum terdiferensiasi, menghasilkan mukopolisakarida, asam aminoglisin dan prolin yang merupakan bahan dasar serat kolagen yang akan mempertautkan tepi luka. Serat kolagen akan dibentuk dan dihancurkan kembali untuk menyesuaikan tegangan luka. Proses ini dibarengi dengan penarikan tepi luka yang pada akhirnya akan meningkatkan kekuatan regangan luka. Fibroblast juga akan mengekspresikan *keratinosit growth factor-2* (KGF-2) dan interleukin-6 (IL-6) yang kemudian akan menyebabkan migrasi keratinosit pada tepi luka ke area membran basal dan mengalami proliferasi dan berdiferensiasi untuk membentuk epidermis sebagai proses dari epitelisasi kulit

luka. Proses ini secara singkat dapat dilihat pada **Tabel 2.1** (Prasetyono,2009;Gurtner, 2007).

3. Fase *Remodelling*

Fase ketiga adalah fase *remodeling* yang berlangsung mulai hari ke-21 hingga sekitar satu tahun. Sel yang terlibat pada fase ini adalah fibrosit, seperti yang tertulis pada **Tabel 2.1**, yang merupakan bentuk inkaktif dari fibroblast. Fase ini segera dimulai setelah kavitas luka terisi oleh jaringan granulasi dan proses re-epitelisasi usai. Proses yang terjadi pada fase ini adalah terbentuknya jaringan parut yang pucat, tipis dan lemas yang akan terus mengalami perubahan hingga kulit dapat menahan regangan $\pm 80\%$ dari kemampuan kulit normal.

Tabel 2.1. Fase Penyembuhan Luka

Fase kesembuhan luka	Waktu post luka	Sel yang terlibat tiap fase	Fungsi atau aktivitas
Hemostasis	Segera setelah luka	Platelet	Bekuan darah
Inflamasi	Hari 1-4	Neutrofil	Fagositosis
Proliferasi	Hari 4-21	Makrofag Makrofag Limfosit Angiosit Neutrofil Fibroblast Keratinosit	Menutupi luka Pembentukan kembali fungsi kulit Penutupan luka
Perbaikan bentuk (maturasi)	Hari 21-2 tahun	Fibrosit	Perkembangan kekuatan tegangan kulit

Sumber: Orsted, *et al.* 2011

2.3 Faktor yang Mempengaruhi Berat Ringannya Luka Bakar

Menurut Rahayuningsih (2012), beberapa faktor yang mempengaruhi berat ringannya luka bakar antara lain yaitu kedalaman luka bakar, luas luka bakar dan usia.

1. Kedalaman Luka Bakar

Kedalaman luka bakar dapat dibagi ke dalam empat kategori yang didasarkan pada elemen kulit yang rusak, meliputi:

- a. Superfisial (derajat I)
- b. Superfisial dermal
- c. Deep dermal
- d. Kedalaman penuh (*full thickness*)

2. Luas Luka Bakar

Beberapa metode untuk menentukan luas luka bakar meliputi *rule of nine*, *Lund and Browder*, dan *hand palm*. Ukuran luka bakar dapat ditentukan dengan menggunakan salah satu dari metode tersebut. Ukuran luka bakar ditentukan dengan presentase dari permukaan tubuh yang terkena luka bakar. Akurasi dari perhitungan bervariasi menurut metode yang digunakan dan pengalaman seseorang dalam menentukan luas luka bakar (Rahayuningsih, 2012).

Dasar dari metode *rule of nine* adalah bahwa tubuh dibagi ke dalam bagian-bagian anatomi, dimana setiap bagian mewakili 9% kecuali daerah genitalia 1%. Metode *Lund and Browder* merupakan modifikasi dari persentasi bagian-bagian tubuh menurut usia, yang dapat memberikan perhitungan yang lebih akurat tentang luas luka bakar. Selain dari kedua metode tersebut di atas, dapat juga digunakan

cara lainnya yaitu menggunakan metode *hand palm*. Metode ini adalah cara menentukan luas atau persentasi luka bakar dengan menggunakan telapak tangan. Satu telapak tangan mewakili 1% dari permukaan tubuh yang mengalami luka bakar.

3. Usia

Usia pasien mempengaruhi berat ringannya luka bakar. Angka kematiannya (*mortality rate*) cukup tinggi pada anak-anak dan pasien yang berusia tua. Pasien usia ini lebih rentan terhadap injuri luka bakar karena kulitnya menjadi lebih tipis, serta kekebalan tubuh yang menurun pada pasien berusia tua.

2.4 Tanaman Singkong

Tanaman singkong (*Manihot esculenta*) merupakan tanaman yang umum dijumpai di daerah Asia, termasuk Indonesia. Bagian singkong yang umum dimanfaatkan oleh masyarakat adalah bagian umbi sementara pemanfaatan bagian daun masih terbatas sebagai bahan tambahan pakan ternak. Daun singkong (*Manihot esculenta*) memiliki struktur daun yang menjari, berbentuk lonjong dengan ujung daun yang tajam, dan memiliki garis pada setian daunnya seperti pada

Gambar 2.2. Daun singkong memiliki banyak kandungan dan manfaat diantaranya (Wobeto, *et al.*, 2007; Omar *et al.*, 2012; Rosiana, dkk., 2013):

- 1) Mineral seperti Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca, P, K, S yang bermanfaat dalam membantu metabolisme tubuh dan kesehatan tulang.
- 2) Flavonoid yang bermanfaat sebagai antioksidan.
- 3) Saponin yang membantu proses pembentukan kolagen.

- 4) Vitamin C berperan sebagai antioksidan, meningkatkan kerja sistem imun tubuh dan sebagai pencegah kanker.
- 5) Vitamin A yang berperan dalam diferensiasi dan pergantian sel.
- 6) Protein berupa asam amino metionin yang akan menginduksi *cysteine*, yaitu faktor pertumbuhan yang berperan dalam sintesis kolagen.
- 7) Vitamin B1 yang berfungsi dalam pembentukan enzim
- 8) Vitamin B2 yang bermanfaat dalam metabolisme karbohidrat
- 9) Triterpenoid yang berperan sebagai anti-bakteri.
- 10) Lemak memiliki sebagai pelarut dari vitamin A, D, E dan K.
- 11) Karbohidrat yang merupakan sumber energi utama bagi tubuh.

Sistematika (taksonomi), tanaman singkong diklasifikasikan sebagai berikut

(Suprpti, 2005):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub-divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: Manihot
Spesies	: <i>Manihot esculenta</i>



Gambar 2.2 Daun Singkong (*Manihot esculenta*) (Ma'mun, 2013).

Hasil penelitian Dewi (2014), menunjukkan bahwa simplisia daun singkong mengandung flavonoid yang lebih banyak dibanding daun singkong rebus, baik pada ekstrak air maupun ekstrak metanol. Data pada **Tabel 2.2** memperlihatkan kadar flavonoid tertinggi terkandung dalam ekstrak metanol daun singkong yaitu sebesar 881.33 mg RE/g dan kadar flavonoid terendah terkandung dalam ekstrak air daun rebus yaitu sebesar 5.27 mg RE/g.

Tabel 2.2. Kadar flavonoid total ekstrak air dan ekstrak metanol daun singkong

Sampel	Kadar Flavonoid Total (mg RE/g)
Ekstrak air daun singkong rebus	5.27 ^a
Ekstrak air daun singkong	7.23 ^a
Ekstrak metanol daun singkong rebus	304.17 ^b
Ekstrak metanol simplisia daun singkong	881.33 ^c

^{a, b, c} menunjukkan korelasi berbeda atau tidak berbeda nyata antar data

Keterangan: RE = Rutin Equivalent

Sumber: Dewi, 2014

Penelitian terhadap luka bakar menggunakan bahan herbal telah banyak dilakukan, contohnya seperti daun kedondong, daun binahong, aloe vera, propolis dan daun sirih. Daun kedondong dan daun binahong mengandung senyawa saponin, tannin dan flavonoid yang berperan sebagai antiinflamasi, antioksidan, dan antibakteri yang mampu mempercepat proses penyembuhan luka bakar (Ahliadi, 2014; Balqis, dkk., 2014). Aloe vera mengandung senyawa polisakarida dan hormon auxin-giberlins yang berperan dalam proses penyembuhan luka dan memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi (Hidayat, 2013). Propolis memiliki pH asam, yaitu berkisar antara 3,85-4,44 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga dapat membantu mempercepat proses penyembuhan luka bakar (Santhi, dkk., 2016). Daun sirih mengandung senyawa saponin, tannin, minyak atsiri, flavonoid dan fenol yang mempunyai kemampuan untuk membantu proses penyembuhan luka serta mengandung vitamin A dan C sebagai nutrisi yang dibutuhkan dalam proses penyembuhan luka (Negara, dkk., 2014).

Kandungan-kandungan yang terdapat pada bahan herbal di atas tidak selengkap kandungan yang terdapat di dalam daun singkong. Daun singkong mengandung senyawa yang beragam dan lengkap untuk mempercepat proses penyembuhan luka seperti yang telah dijelaskan sebelumnya.

2.5 Malondialdehida (MDA)

Asam lemak tak jenuh ganda yang mengandung dua atau lebih ikatan rangkap sangat rentan terhadap oksidasi oleh radikal bebas atau molekul reaktif. Molekul reaktif seperti radikal hidroksil akan menarik atom hidrogen dari ikatan rangkap

asam lemak tak jenuh dan membentuk radikal peroksil lipid. Radikal ini kemudian akan bereaksi dengan asam lemak tak jenuh lainnya membentuk hidroperoksida lipid dan radikal peroksil lipid yang baru, yang kemudian meneruskan reaksi oksidasi terhadap lipid lainnya, yang dikenal dengan auto-oksidasi lipid atau peroksidasi lipid. Proses tersebut juga akan membentuk endoperoksida siklik yang akan terurai menjadi malondialdehid (Mardiani, 2008).

MDA memiliki berat molekul rendah dan sering digunakan sebagai indikator peroksidasi lipid. Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan dasar reaksi MDA dengan asam tiobarbiturat (TBA) yang membentuk senyawa berwarna MDA-TBA₂ dan mengabsorpsi sinar dengan panjang gelombang 530 nm. Senyawa berwarna tersebut dapat diukur konsentrasinya berdasarkan absorbansi warna yang terbentuk, dengan membandingkannya pada absorbansi warna larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya menggunakan spektrofotometer (Mardiani, 2008). MDA secara normal dibentuk oleh mitokondria selama proses respirasi seluler dalam pembentukan adenosin trifosfat (ATP) (Widayati, 2017). Radikal bebas yang terdapat didalam tubuh dapat menyebabkan proses peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan proses oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh penyusun fosfolipid membran sel yang menghasilkan senyawa malondialdehid (MDA) (Yustika dkk, 2013).

2.6 Anatomi dan Histologi Kulit

Kulit adalah organ tubuh yang terletak paling luar dan membatasinya dari lingkungan hidup. Kulit bersifat sangat kompleks, elastis, dan sensitif. Kulit

merupakan organ terbesar tubuh, terdiri dari lapisan sel di permukaan yang disebut epidermis yang berasal dari ektoderm permukaan dan lapisan jaringan ikat yang lebih dalam yaitu dermis yang berasal dari mesenkim. Hipodermis atau subkutan adalah jaringan di bawah dermis, yang tersusun berupa jaringan ikat longgar yang banyak mengandung adiposit. Hipodermis mengikat kulit secara longgar dengan organ yang lebih dalam seperti otot dan tulang, yang dibatasi dengan fascia (Mescher, 2013). Histologi kulit normal dapat dilihat pada **Gambar 2.3**.

1. Epidermis

Epidermis terdiri atas keratinosit sekitar 90% dan memproduksi keratin. Keratin adalah protein fibrosa yang keras dan dapat memproteksi kulit dari gesekan, panas, bahan kimia dan mikroorganisme. Keratinosit juga memproduksi granula lamela yang bersifat kedap air sehingga mencegah air dan material lain keluar atau masuk melewati kulit. Melanosit menyusun epidermis 8%, berfungsi menghasilkan melanin yang merupakan pigmen berwarna kuning kemerahan atau coklat kehitaman yang berfungsi memberi warna kulit dan menyerap sinar ultraviolet (Mescher, 2013). Menurut Mescher (2013) menjelaskan bahwa epidermis terdiri atas lima lapisan yang tersusun dari yang paling dalam, yaitu:

- a. *Stratum basal (stratum germinativum)*, terdiri atas selapis sel kuboid atau silindris basofilik yang terletak di atas *lamina basalis* pada perbatasan epidermis-dermis,
- b. *Stratum spinosum*, terdiri atas sel-sel kuboid, atau agak gepeng dengan inti di tengah dan sitoplasma dengan cabang-cabang yang terisi berkas filamen,

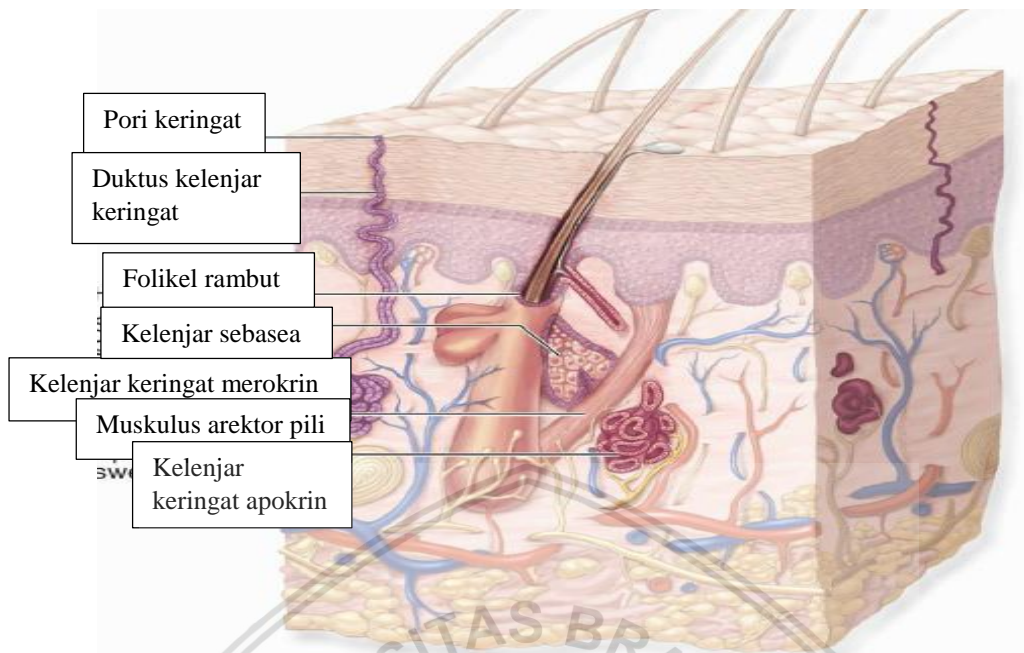
- c. *Stratum granulosum*, terdiri atas 3-5 lapis sel poligonal gepeng yang sitoplasmanya berisikan granul basofilik kasar,
- d. *Stratum lucidum*, tampak lebih jelas pada kulit tebal, lapisan ini bersifat translusens dan terdiri atas lapisan tipis sel epidermis eosinofilik yang sangat gepeng,
- e. *Stratum corneum*, lapisan ini terdiri atas 15-20 lapis sel gepeng berkeratin tanpa inti dengan sitoplasma yang dipenuhi *scleroprotein filamentosa birefringen*, yakni keratin.

2. Dermis

Dermis terdiri atas dua lapisan dengan batas yang tidak nyata, *stratum papilare* di sebelah luar dan *stratum retikular* yang lebih dalam.

- a. *Stratum papilar*, terdiri atas jaringan ikat longgar, fibroblas dan sel jaringan ikat lainnya terdapat di stratum ini seperti sel mast dan makrofag. Dari lapisan ini, serabut lapisan kolagen khusus menyelip ke dalam *lamina basalis* dan meluas ke dalam dermis. Serabut kolagen tersebut mengikat dermis pada epidermis dan disebut serabut penambat.
- b. *Stratum retikular*, terdiri atas jaringan ikat padat tak teratur (terutama kolagen tipe I), dan oleh itu memiliki lebih banyak serat dan lebih sedikit sel daripada *stratum papilar*.

Dermis kaya dengan pembuluh darah dan limfa. Selain komponen tersebut, dermis mengandung folikel rambut, kelenjar keringat dan kelenjar sebacea (Mescher, 2013).

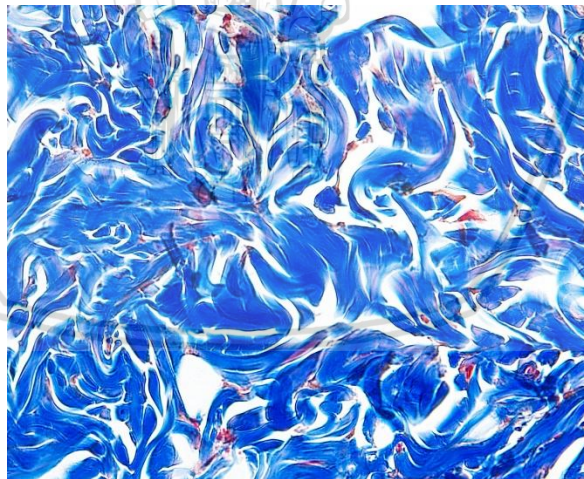


Gambar 2.3. Histologi kulit (Mescher, 2013).

2.7 Kolagen

Kolagen merupakan protein fibrosa (berserat) terbanyak dan membentuk 30% massa protein dalam tubuh. Protein fibrosa lainnya adalah keratin dan miosin. Kulit memperoleh kekuatan dan kelenturan dari jalinan serat kolagen dan keratin yang saling bersilangan. Kolagen mengandung sekitar 33% glisin dan 21% prolin. Prekursor kolagen, tropokolagen adalah suatu tripel heliks yang terdiri dari tiga rantai polipeptida yang saling menjalin membentuk struktur mirip tambang dengan daya regang yang besar. Serabut kolagen berwarna merah muda pada pewarnaan hematoxylin eosin, berwarna biru pada pewarnaan Mallory trichrome, berwarna hijau-biru atau hijau pada pewarnaan Masson trichrome dan Gomori trichrome seperti pada **Gambar 2.4** (Mescher, 2013).

Serabut kolagen merupakan serabut paling banyak di jaringan penyambung. Serabut ini merupakan benang tidak berwarna, yang dalam jumlah besar akan terlihat berwarna putih, di bawah mikroskop polarisasi bersifat bias ganda yang merupakan tanda bahwa serabut ini mengandung molekul-molekul panjang dan paralel, tidak bersifat elastis, membentuk berkas tidak bercabang, susunan molekulnya mempunyai daya rentang yang lebih besar dari pada baja, sebagai akibatnya serabut kolagen memberi kombinasi unik dari kelenturan dan kekuatan kepada jaringan dimana serabut ini berada. Asam amino utama penyusun serabut kolagen adalah : glisin, prolin dan hidroksiprolin, serabut ini dibuat oleh fibroblas, terdapat dalam jumlah banyak pada jaringan ikat padat, dan berjumlah moderat dalam jaringan ikat longgar (Harjana, 2011).



Gambar 2.4 Serat kolagen yang berwarna biru pada pewarnaan Mallory trichrome (Kuehnel, 2003).

Terdapat beberapa tipe kolagen yang ditandai dengan angka Romawi (Mescher, 2013).

1. Kolagen tipe I

Tipe kolagen yang bersifat nonargirofilik, dapat ditemukan di sebagian besar jaringan ikat, termasuk kulit, tulang dan dentin gigi. Kolagen tipe I ini berfungsi untuk menahan regangan.

2. Kolagen tipe II

Tipe kolagen yang terlihat seperti gumpalan fibril longgar, dapat ditemukan pada tulang rawan dan vitreus humor, serta memiliki fungsi dalam menahan regangan.

3. Kolagen tipe III

Serat kolagen bersifat argirofilik dan halus. Kolagen tipe ini dapat ditemukan pada kulit, otot dan pembuluh darah, serta berfungsi dalam memelihara struktur organ yang dapat meregang.

4. Kolagen tipe IV

Kolagen tipe ini terdapat pada semua membran basal namun hanya dapat terdeteksi dengan imunositokimia dan berperan sebagai penunjang struktur halus.

5. Kolagen tipe V

Kolagen tipe ini terlihat seperti serat yang terbentuk bersamaan dengan kolagen tipe I, dapat ditemukan pada jaringan fetal, kulit, tulang dan plasenta. Berperan dalam membantu fungsi dari kolagen tipe I.

6. Kolagen tipe VI

Tipe kolagen yang dapat ditemukan pada lamina basal.

7. Kolagen tipe VII

Tipe kolagen yang terdapat pada epitel dan hanya dapat terdeteksi dengan imunositokimia serta berfungsi dalam menghubungkan laminal basal epitel kulit pada stroma dibawahnya.

8. Kolagen tipe VIII

Kolagen tipe ini berbentuk poligonal yang ditemukan pada membran basal dan endotel, serta berfungsi dalam menahan tekanan.

9. Kolagen tipe IX

Tipe kolagen yang terdeteksi dengan imunositokimia dan terdapat pada tulang rawan serta korpus vitreus, berfungsi bersamaan dengan kolagen tipe II.

10. Kolagen tipe X

Tipe kolagen yang ditemukan pada lempeng epifisis dan berperan pada proses osifikasi endokondral.

11. Kolagen tipe XI

Tipe kolagen yang berserat kecil, ditemukan pada tulang rawan dan memiliki fungsi untuk membantu fungsi dari kolagen tipe I.

2.8 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Hewan laboratorium atau hewan percobaan dapat digunakan sebagai media dalam penelitian atau pengamatan laboratorik untuk mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan. Hewan coba yang banyak digunakan dalam penelitian adalah tikus, mencit, marmut, kelinci, hamster, unggas, kambing, domba,

sapi, kerbau, kuda, dan simpanse. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) telah diketahui sifat-sifatnya secara baik, mudah dipelihara, dan merupakan hewan yang adaptif serta cocok untuk berbagai penelitian. Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* (**Gambar 2.5**) antara lain memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm. *Rattus norvegicus* memiliki frekuensi denyut jantung 330-480 kali per menit, frekuensi respirasi 85 kali per menit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Armitage, 2004).

Tikus digunakan untuk penelitian karena tingkat reproduksinya yang tinggi, mudah dipelihara, hewan yang relatif sehat, dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Koch, 2006). Berikut klasifikasi tikus yang digunakan dalam penelitian menurut Armitage (2004), yaitu:

Kingdom : Animalia
Divisi : Chordata
Kelas : Mammalia
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus*
Strain : Wistar

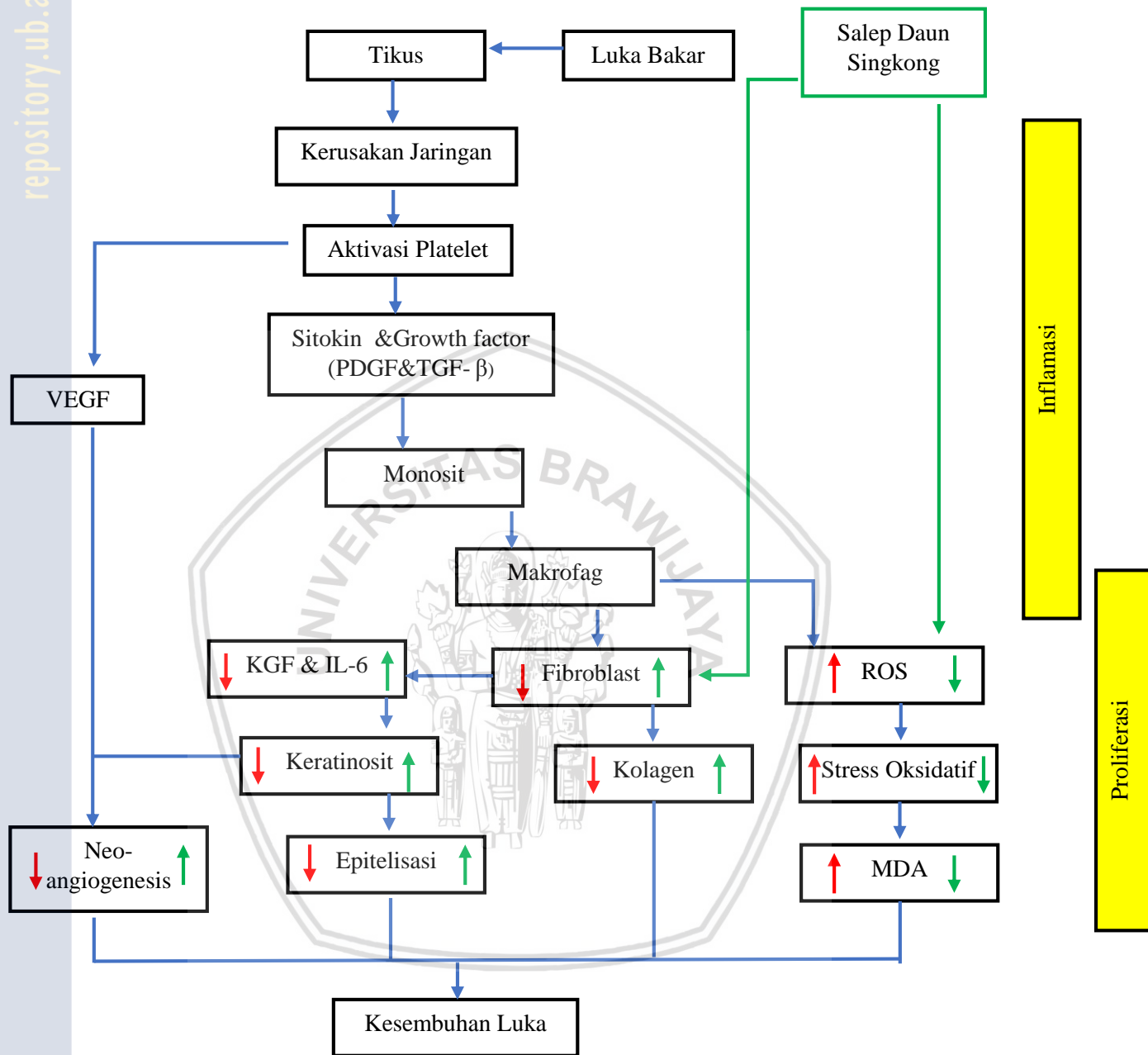


Gambar 2.5 Tikus putih *strain* Wistar (*Rattus norvegicus*) (Armitage, 2004)

Penelitian tentang luka bakar yang telah dilakukan, umumnya menggunakan tikus putih dari *strain Sprague-Dawley* karena ukuran tubuhnya cukup besar dan sangat jinak atau *strain* Wistar yang ukuran tubuhnya lebih kecil dari *strain Sprague-Dawley*, namun lebih mudah menyesuaikan diri dengan lingkungannya dan cenderung lebih jinak (Surnina, 2009). Dasar pemilihan hewan coba tikus dan kaitannya dengan luka bakar adalah karena struktur anatomi kulit pada tikus yang mempunyai kemiripan dengan struktur anatomi pada spesies hewan vertebrata lainnya. Pada percobaan ini digunakan tikus putih jantan karena tikus putih jantan dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil. Tikus putih jantan juga mempunyai kecepatan metabolisme obat yang lebih cepat dan kondisi biologis tubuh yang lebih stabil dibanding tikus betina (Ermawati, 2010). Penggunaan tikus putih sebagai hewan coba suatu penelitian terkait luka bakar telah dilakukan sebelumnya oleh Fitri pada tahun 2015 dan Balqis dkk pada tahun 2014.

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konseptual

Keterangan:

↑ : Pengaruh Induksi Luka Bakar

↓ : Pengaruh Pemberian Terapi

Tikus coba diinduksi luka akar menggunakan solder listrik yang dimodifikasi dengan *stainless steel* berukuran 2x2 cm. Solder dipanaskan selama 5 menit dan ditempelkan pada kulit selama 5 detik. Perlakuan ini akan menyebabkan kerusakan jaringan dan sel endotel yang kemudian akan memicu aktivasi platelet sebagai respon hemostasis.

Aktivasi platelet akan menyebabkan terjadinya perubahan kondisi jaringan menjadi hypoksia, yang akan menginduksi ekspresi *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF ini kemudian bersama dengan keratinosit akan berperan dalam pembentukan pembuluh darah baru. Platelet kemudian akan mengalami degranulasi, melepaskan mediator pro-inflamasi dan *growth factor* (*platelet derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor- β* (TGF- β)).

PDGF yang dilepaskan pada area luka merupakan kemoatraktan untuk monosit. Monosit pada pembuluh darah kemudian akan keluar dan bergerak ke jaringan luka. Monosit kemudian akan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag berperan dalam fagositosis jaringan mati yang disebabkan oleh luka bakar, menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) serta melepaskan PDGF dan *epidermal growth factor* (EGF) yang akan menginduksi migrasi serta proliferasi dari fibroblast.

Proses fagositosis yang dilakukan oleh makrofag membutuhkan asupan oksigen (O_2) dan akan menghasilkan ROS. Proses fagositosis pada fase inflamasi oleh makrofag akan meningkat yang berarti asupan O_2 serta ROS yang terbentuk pun meningkat. Peningkatan ROS ini dapat berdampak negatif, akibat terjadinya reaksi ROS dengan asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel. Reaksi ini disebut dengan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid dapat menyebabkan stress oksidatif yang akan merusak sel. Hal ini disebabkan oleh produk akhir dari proses peroksidasi lipid yaitu aldehid, seperti *Malondialdehida* (MDA) yang bersifat sitotoksik, sehingga tingkat kerusakan sel dapat diukur melalui pengukuran kadar MDA.

Makrofag akan melepaskan PDGF dan *epidermal growth factor* (EGF) yang kemudian memicu migrasi dan proliferasi dari fibroblast merupakan tanda dimulainya fase proliferasi. Fibroblast akan menghasilkan mukopolisakarida, asam aminoglisin dan prolin sebagai bahan dasar dari serat kolagen. Serat kolagen akan menyesuaikan tegangan luka dan akan mempertautkan tepi luka, sehingga terjadilah perbaikan kulit. Fibroblast juga akan mengekspresikan *keratinosit growth factor-2* (KGF-2) dan interleukin-6 (IL-6) yang kemudian akan menyebabkan migrasi keratinosit pada tepi luka ke area membran basal dan mengalami proliferasi dan berdiferensiasi untuk membentuk epidermis sebagai proses dari epitelisasi kulit luka.

Kandungan yang terdapat dalam daun singkong dapat membantu proses kesembuhan luka bakar. Flavonoid dan vitamin C yang membantu untuk mencegah terjadinya stress oksidatif dengan berperan sebagai antioksidan, selain itu dapat pula memicu peningkatan jumlah sel imun yang dibutuhkan. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang mampu memberikan atom hidrogen kepada radikal bebas dalam hal ini ROS yang kemudian akan menurunkan reaktivitas dari ROS. Penurunan reaktivitas ini akan menekan reaksi ROS dengan lemak sehingga mampu mencegah terjadinya peroksidasi lipid. Hal ini dapat dilihat melalui penurunan kadar *malondialdehyde* (MDA) yang merupakan produk hasil peroksidasi lipid yang bersifat sitotoksik. Triterpenoid yang berperan sebagai antibakteri yang mencegah infeksi sekunder pada luka bakar. Saponin pada daun singkong berperan dalam pembentukan fibroblast, kolagen serta memicu pembentukan pembuluh darah baru, yang dibutuhkan pada fase proliferasi dari proses kesembuhan luka. Vitamin C juga memiliki peranan yang penting dalam pembentukan kolagen karena vitamin C diperlukan untuk hidroksilasi prolin dan lisin menjadi hidroksiprolin dan hidroksilisin yang merupakan bahan penting dalam pembentukan kolagen.

3.2 Hipotesis Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian salep daun singkong dapat menurunkan kadar *malondialdehida* (MDA) pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) model luka bakar
2. Pemberian salep daun singkong dapat mempercepat pembentukan kolagen pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) model luka bakar



BAB IV METODELOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juni 2017 di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Ekstraksi daun singkong dilakukan di UPT. Materia Medica Batu. Perhitungan kadar MDA dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, sedangkan pembuatan preparat histopatologi kulit dilakukan di Laboratorium Histologi, Universitas Airlangga.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar jantan dengan berat badan antara 150-200 gram umur 8-12 minggu, ketamin HCL 1%, Xylazine 2%, daun singkong, adeps lanae, *underpad*, tisu, NaCL fisiologis, PFA 10%, BNF 10%, kassa, plaster luka, alkohol 70%, glove steril, sekam, masker, kapas, aquades pro-inj, pewarnaan Mallory, 500 µl aquades, 0,5 mL TCA 10%, 200 µl HCL 1N, 100 µl Na-Thio 1%, etanol 95%, es batu dan air mineral.

4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, jas laboratorium, kandang dan tempat minum tikus, kain *handling*, *scalpel*, *blade*, gunting tajam-tumpul, gunting tajam-tajam, pinset anatomis, pinset chirurgis, papan bedah, *baker*

glass, pot organ, *object glass*, *cover glass*, *vortex*, mikroskop, timbangan, solder modifikasi berukuran 2x2 cm, rotavapor, oven, kandang pemeliharaan, spektrofotometer, sentrifugasi dan *waterbath*.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, serum darah hewan coba untuk perhitungan kadar MDA dan organ kulit luka bakar tikus model.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu membagi subyek menjadi lima kelompok secara acak. Setiap kelompok terdiri dari lima tikus. Kelompok A adalah tikus sehat sebagai kontrol negatif, kelompok B adalah tikus yang diberi luka bakar tanpa terapi (kontrol positif), kelompok C, D, E (kelompok terapi) adalah kelompok tikus yang diberi luka bakar dan diterapi dengan salep daun singkong dengan konsentrasi masing-masing 4%, 8%, dan 12% (**Lampiran 1**). Penelitian ini menggunakan besaran sampel dengan rumus Frederer

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1)4 \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75 \text{ dibulatkan menjadi } 5.$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 5 kali dalam setiap kelompok sehingga total hewan coba yang dibutuhkan adalah 25 ekor tikus.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variable yang diamati dalam penelitian ini yaitu:

- Variable bebas : konsentrasi salep daun singkong
- Variable tergantung : histopatologi kulit dan kadar MDA
- Variable kontrol : hewan coba strain tikus Wistar jantan, umur, berat badan, lingkungan, suhu kandang, minum dan pakan.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparat Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diaklimatisasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian pakan standar. Pakan tikus berbentuk pelet yang diberikan dua kali sehari secara teratur. Air minum untuk tikus diberikan secara *ad libitum*. Tikus diletakkan dalam kandang plastik yang disekat menjadi 4 ruang dengan jumlah empat ekor tikus perkandang. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan. Lantai kandang mudah dibersihkan.

4.6.2 Hewan Model Luka Bakar

Area kulit yang akan dibuat luka bakar dicukur sepanjang 3 cm dan lebar 3 cm agar kulit dapat terekspose dalam pembuatan luka bakar selebar 2 cm. Kulit kemudian didesinfeksi menggunakan alkohol dan dilakukan anestesi umum. Anestesi yang digunakan adalah kombinasi antara ketamin HCL 1% dengan xylazine 2% (**Lampiran 2**). Kombinasi antara ketamin dengan xylazine merupakan kombinasi yang baik, ketamin memberikan efek analgesik sedangkan xylazine memberikan efek sebagai muskulorelaksan (Yudaniyanti, dkk., 2010). Induksi luka bakar dilakukan dengan memanaskan terlebih dahulu solder modifikasi selama 5 menit, kemudian ditempelkan pada kulit punggung tikus selama 5 detik. Perlakuan ini akan membentuk luka bakar derajat II yang ditandai dengan kerusakan jaringan hingga lapisan dermis kulit (AlQahtani *et al*, 2014). Pembuatan luka bakar menggunakan solder modifikasi dengan *stainless steel* berukuran 2x2 cm yang dipanaskan selama 5 menit dan ditempelkan pada kulit punggung tikus selama 5 detik menunjukkan gejala klinis telah terbentuknya luka bakar derajat II. Solder modifikasi yang digunakan memiliki spesifikasi 60 watt dengan voltase 240 volt (Sarkhail, 2010).

4.6.3 Pembuatan Salep Daun Singkong

4.6.3.1 Ekstraksi Daun Singkong

Daun singkong yang basah kemudian dicuci dan dipotong kecil-kecil. Daun singkong yang digunakan adalah daun yang berada pada bagian tengah pohon, yaitu pada helai ke-4 hingga ke-7, untuk menghindari kandungan sianida, daun singkong

yang digunakan sebanyak ± 2 kg yang kemudian dioven selama sehari hingga kering. Daun singkong kering tersebut selanjutnya diekstraksi dengan maserasi etanol 95% selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap harinya. Larutan tersebut kemudian dipekatkan dengan rotavapor dengan suhu 500°C dan putaran 90 rpm.

Ekstraksi daun singkong yang diperoleh kemudian dibagi menjadi beberapa sediaan konsentrasi salep yaitu 4% untuk kelompok terapi C, 8% untuk kelompok terapi D, dan 12% untuk kelompok terapi E. Pembagian kelompok terapi ini didasarkan atas hasil penelitian Meilawaty (2013).

4.6.3.2 Pembuatan Konsentrasi Salep

Basis salep menggunakan *adepts lanae*. *Adepts lanae* memiliki peran sebagai basis salep serap yang dapat memperpanjang kontak bahan obat dengan kulit dan dapat menyerap cairan yang dihasilkan oleh luka (Fajriansyah, 2016).

Lumping dipanaskan beserta alu di dalam oven dengan suhu 50°C , kemudian dikeluarkan dari oven. *Adepts lanae* dimasukkan kemudian diaduk secara konstan hingga homogen. Ekstrak daun singkong ditambahkan sesuai konsentrasi yang dibutuhkan dan diaduk hingga homogen.

Sediaan salep yang digunakan pada penelitian ini dibuat sebanyak 20 gram yang masing-masing sediaan salep mengandung 4%, 8%, dan 12% ekstrak daun singkong. Basis salep ini dicampurkan dengan ekstrak daun singkong hingga membentuk sediaan salep. Sediaan obat salep ini dipilih karena dapat menyerap sekresi cairan (Fajriansyah, 2016).

Total sediaan salep sebanyak 20 gram disesuaikan dengan perhitungan salep yang diberikan, yaitu untuk setiap olesan pada luka bakar sepanjang 2 cm akan

digunakan $\pm 0,1$ gram salep yang diberikan 2 kali sehari selama 14 hari berturut-turut dengan jumlah tikus tiap kelompok terapi sebanyak 5 ekor. Masing-masing bahan ditimbang untuk membuat salep ekstrak daun singkong dengan konsentrasi ekstrak kental masing-masing 4%, 8%, dan 12% dan dicampurkan (**lampiran 3**). Sediaan salep kemudian disimpan di dalam wadah plastik yang ditutup rapat dan ditaruh pada tempat yang kering dan tidak terkena sinar matahari secara langsung.

4.6.4 Pemberian Terapi Salep Daun Singkong

Terapi pemberian salep daun singkong diberikan pada hewan coba langsung setelah dilakukan perlakuan sesuai dengan kelompok yang sudah ditentukan. Perlakuan dilakukan 2 kali sehari (pagi dan sore hari) sebanyak $\pm 0,1$ gram untuk sekali pemberian. Perlakuan dilakukan selama 14 hari berturut-turut. Terapi yang dilakukan secara topikal sesuai dengan luas dari luka (Khazaeli *et al*, 2014).

4.6.5 Pengambilan Organ Kulit

Tikus model dieutanasi dengan ketamine 1%, lalu diposisikan rebah dorsal dan difiksasi dengan jarum dipapan bedah pada semua bagian telapak kaki. Kulit bagian punggung dicubit dengan pinset chirurgis dan digunting kulit menggunakan gunting tajam-tajam mengelilingi bagian kulit yang diinduksi luka bakar diikuti dengan bagian kulit yang normal sebagai perbandingan antara kondisi kulit yang sehat dengan kulit yang sedang dalam fase penyembuhan. Bagian kulit yang akan dijadikan sebagai preparat histologi dipisahkan dengan muskulus. Pemisahan ini dilakukan dengan cara menguakkan secara perlahan bagian subkutan. Sampel

kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis untuk membuang kotoran yang menempel. Sampel dimasukkan ke dalam pot berisi PFA 10%, disimpan pada suhu ruang dan dikirim ke tempat pembuatan preparat histopatologi (Fajriansyah, 2016).

4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit

Pembuatan preparat histopatologi (**lampiran 4**) menggunakan pewarnaan Mallory berdasarkan studi yang dilakukan oleh Isrofah, dkk (2013). Jaringan kulit yang telah diisolasi dicuci dengan NaCl fisiologis, dilanjutkan dengan fiksasi menggunakan larutan BNF (Buffer Neutral Formaline) 10%, selanjutnya dilakukan trimming, dehidrasi dengan alkohol bertingkat, lalu embedding atau parafinisasi, kemudian blok parafin yang sudah membeku dipotong dengan mikrotom ketebalan 5 µm dan dilakuka proses pewarnaan dengan Mallory. Preparat kemudian diamati dengan mikroskop perbesaran 100x.

4.6.7 Pengambilan Gambar Histopatologi Kulit

Preparat histopatologi yang sudah jadi diamati menggunakan mikroskop Olympus CX41 yang dilengkapi dengan aplikasi DP2-BSW menggunakan perbesaran 40x dan 100x. Histopatologi kulit dianalisis secara kualitatif deskriptif dengan melihat pertumbuhan kolagen pada area luka bakar (Balqis dkk, 2014).

4.6.8 Pengukuran Kadar MDA Serum

Semua tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dieutanasi pada hari ke-15 dengan ketamin 1%. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) diposisikan rebah

ventral. Dilakukan pengambilan darah dengan rute intracardiac menggunakan *disposable syringe* ukuran 5 ml dan dilakukan pengukuran kadar MDA serum (**lampiran 5**) dapat dilakukan dengan menambahkan 200 μ L serum darah dengan 500 μ L aquades, 0,5 mL TCA 10%, 200 Ml HCL 1N dan 100 μ L Na-Thio 1% yang kemudian dihomogenkan dengan vortex, lalu disentrifugasi selama 10 menit pada 500 rpm, dan dipanaskan dengan air bersuhu 100°C selama 25 menit. Pengukuran kadar MDA dilakukan menggunakan kurva baku MDA yang telah dibuat. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 530 nm kemudian diukur menggunakan spektrofotometer (Shofia, 2013).

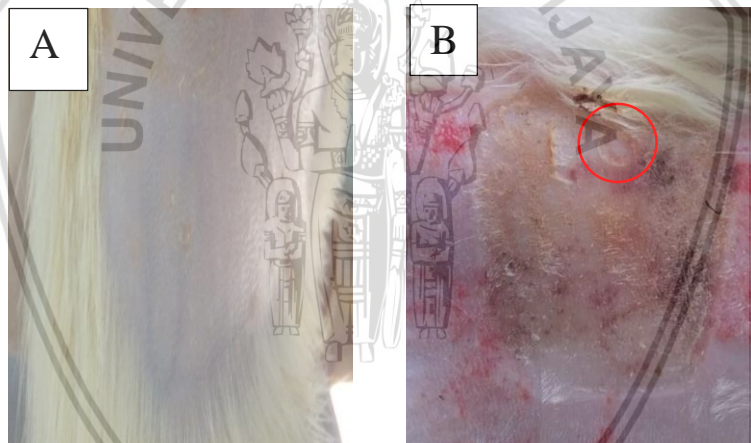
4.6.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis kuantitatif dan kualitatif deskriptif. Analisis kuantitatif statistik untuk kadar MDA menggunakan program SPSS 22.0 dengan uji *one-way ANOVA* untuk melihat pengaruh dari perlakuan terhadap kelompok yang ditunjukkan dengan adanya satu atau lebih kelompok yang berbeda nyata (Sig <0,05), lalu data dilanjutkan dengan uji Turkey $\alpha = 5\%$ untuk melihat kelompok mana yang berbeda nyata dengan kelompok lainnya. Analisis kualitatif deskriptif untuk pengamatan histopatologi kulit dengan mengamati pertumbuhan kolagen menggunakan mikroskop *Olympus CX41* yang dilengkapi dengan aplikasi DP2-BSW menggunakan perbesaran 40x dan 100x.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Gambaran Luka Bakar Derajat II pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) menggunakan Solder Modifikasi

Hasil gambaran makroskopis dari pembuatan luka bakar menggunakan solder modifikasi yaitu terlihat telah terbentuknya bula serta warna kulit yang sedikit pucat seperti yang terlihat pada **Gambar 5.1**. Gambaran ini menunjukkan dari perlakuan luka bakar telah terbentuk luka bakar derajat II, dimana luka bakar yang terbentuk memiliki kriteria yaitu terbentuknya bula, kering dan kulit berwarna pucat kemerahan (Suvarna dkk., 2013).

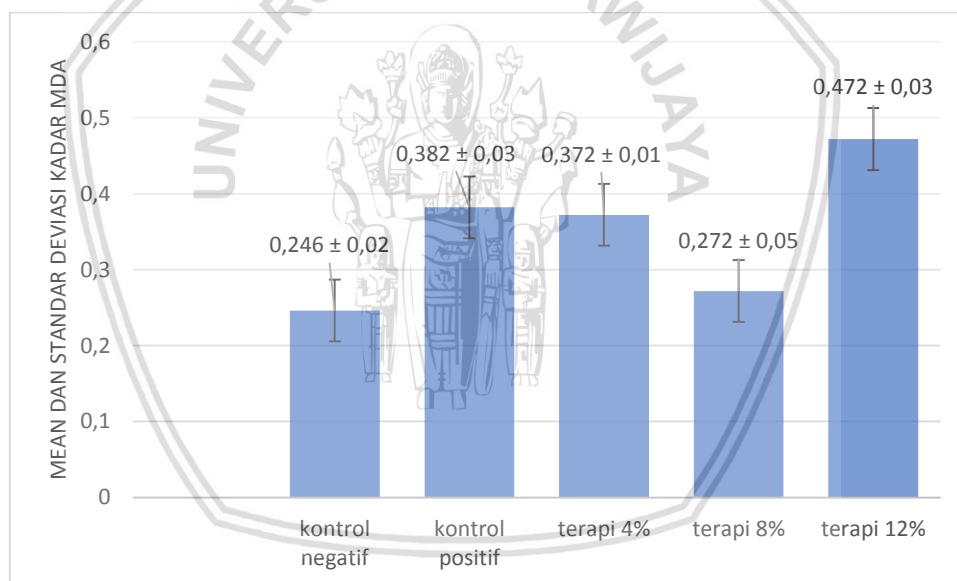


Gambar 5.1 A.Kulit normal, B. Kulit perlakuan luka bakar derajat II, ditandai dengan adanya bula.

5.2 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Singkong terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) Hewan Tikus Model Luka Bakar Derajat II

Hasil pengukuran kadar MDA menggunakan metode *Thiobarbituric acid* (TBA) menunjukkan bahwa pemberian salep ekstrak daun singkong sebagai terapi luka bakar dapat mempengaruhi kadar MDA. Hasil penelitian ditunjukkan pada

grafik nilai rata-rata kadar MDA (**Gambar 5.2**), kelompok terapi salep ekstrak daun singkong 8% memiliki nilai rata-rata kadar MDA terendah yaitu $0,272 \pm 0,05$ ng/200 μ L dibandingkan dengan kelompok kontrol positif $0,382 \pm 0,03$ ng/200 μ L. Kelompok terapi 4% dan 8% menunjukkan adanya penurunan kadar MDA dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, namun pada kelompok terapi 12% kadar MDA meningkat melebihi kelompok kontrol positif. Kadar MDA yang tinggi pada kelompok terapi 12% kemungkinan disebabkan oleh lebih tingginya antioksidan dari pada radikal bebas yang kemudian mengakibatkan kadar MDA meningkat.



Gambar 5.2 Histogram nilai *mean* dan standar deviasi kadar MDA.

Berdasarkan **Gambar 5.2**, kadar MDA serum masih dapat terdeteksi pada tikus normal (kontrol negatif). Kadar MDA pada kelompok kontrol negatif berasal dari radikal bebas yang secara normal dibentuk oleh mitokondria selama proses respirasi seluler dalam pembentukan adenosin trifosfat (ATP) (Widayati, 2017).

Radikal bebas yang berlebihan didalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan proses oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh penyusun fosfolipid membran sel yang menghasilkan senyawa malondialdehid (MDA) (Yustika dkk, 2013).

Menurut Jawad *et al* (2008), penghasil utama radikal bebas pada trauma luka bakar adalah aktivasi neutrofil dan enzim xantin oksidase. Aktivasi neutrofil ini terjadi sebagai respon tubuh saat terjadi trauma untuk memulai terjadinya inflamasi, yang kemudian akan menghasilkan radikal superoksida anion. Enzim xantin oksidase memiliki peranan yang penting dalam menghasilkan radikal superoksida anion dan hydrogen peroksida, melalui katalisis hypoxantin dan xantin menjadi asam urat. Menurut Nielson *et al* (2017), setelah terjadi luka bakar, adenosine triphosphat akan menurun kadarnya pada jaringan sedangkan adenosin monophosphat meningkat, yang selanjutnya akan diubah menjadi hypoxantin. Oleh karena itu, saat terjadi luka bakar kadar hypoxantin meningkat pada jaringan dan terjadi peningkatan katalisis hypoxantin menjadi asam urat, sehingga radikal bebas yang terbentuk pun meningkat. Radikal bebas memiliki peran penting sebagai antimikroba dan kesembuhan luka, namun pada kondisi luka bakar, jumlah radikal atau ROS yang terbentuk tak terkontrol, sehingga menyebabkan kerusakan. Kerusakan sel akibat radikal bebas setelah terjadi luka bakar menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid pada sistemik dan jaringan, yang dapat dilihat dari peningkatan produk hasil peroksidasi lipid seperti malondialdehid (MDA).

Menurut Yildirim *et al* (2012), *malondialdehyde* (MDA) merupakan marker kerusakan jaringan dan sel akibat terjadinya proses peroksidasi lipid yang

meningkat dalam tubuh, oleh karenanya akan lebih akurat jika perhitungan kadar MDA pada kasus luka bakar dilakukan pada jaringan yang mengalami kerusakan, sehingga data yang didapatkan lebih akurat. Namun pada penelitian sebelumnya oleh Atik *et al* (2004), Jawad *et al* (2008) dan Zang *et al* (2007), diketahui bahwa terdapat hubungan antara kejadian luka bakar dengan peningkatan kadar MDA dalam serum. Namun mekanisme pasti mengenai proses bagaimana luka bakar dapat berpengaruh terhadap kadar MDA dalam serum belum diketahui. Menurut Jawad *et al* (2008), diketahui bahwa saat terjadi luka bakar terjadi peningkatan aktivitas xhantine oxidase pada pembuluh darah yang mana xanthine oksidase ini berperan sebagai sumber radikal bebas utama pada pasien luka bakar.

Kadar MDA serum pada kelompok kontrol positif lebih tinggi dibandingkan dengan kadar MDA pada kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.2**). Peningkatan kadar MDA menunjukkan bahwa terjadi peningkatan radikal bebas yang terdapat didalam tubuh. Radikal bebas didalam tubuh selain dihasilkan oleh mitokondria secara normal, dapat pula dihasilkan melalui aktivasi makrofag dan neutrofil selama tahap inflamasi. Aktivasi makrofag dan neutrofil akibat luka bakar yang dibuat pada tikus model akan menyebabkan peningkatan penggunaan glukosa dan oksigen yang akan digunakan untuk fagositosis jaringan yang mati sehingga radikal bebas yang dibentuk pun meningkat dalam tubuh (Widayati, 2017).

Perlakuan luka bakar pada tikus model dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA akibat terjadinya peningkatan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid terjadi karena adanya peningkatan *Reactive oxygen species* (ROS) yang terbentuk pada fase inflamasi dari proses kesembuhan luka. Pembentukan radikal bebas dari

peroksidasi lipid merupakan petunjuk penting dari kerusakan sel yang diakibatkan oleh ROS. Peroksidasi lipid merupakan inisiasi reaksi berantai oleh radikal bebas (ROS) dengan adanya penarikan atom hidrogen yang berisi satu elektron dari ikatan ganda pada asam lemak yang kemudian menyebabkan lipid terdegradasi dan terbentuknya MDA (Horton, 2003).

Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) (**Lampiran 6**) sehingga data dilanjutkan dengan uji *One Way* ANOVA. Hasil uji *One Way* ANOVA menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) dari salep ekstrak daun singkong yang diberikan pada tikus sebagai terapi luka bakar derajat II berdasarkan kadar MDA (**Lampiran 6**). Secara statistik didapatkan nilai Sig lebih kecil dari 0,05 yang dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh dari salep ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan luka bakar derajat II yang ditinjau dari kadar MDA. Data selanjutnya dianalisis dengan uji Tukey.

Tabel 5.1 Hasil Uji Tukey Kadar MDA Serum

Kelompok Perlakuan	Rata-rata kadar MDA (ng/200 μ L) \pm SD
Kontrol negatif (A)	0,246 \pm 0,02 ^a
Kontrol positif (B)	0,382 \pm 0,03 ^b
Dosis terapi salep 4% (C)	0,372 \pm 0,01 ^b
Dosis terapi salep 8% (D)	0,272 \pm 0,05 ^a
Dosis terapi salep 12% (E)	0,472 \pm 0,03 ^c

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$).

Berdasarkan hasil uji Tukey didapatkan hasil bahwa kelompok terapi 8% tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, kelompok terapi 4% tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif, sedangkan kelompok terapi 12% berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif dan positif. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok terapi 8% lebih efektif dalam menurunkan kadar MDA jika dibandingkan dengan kelompok terapi 4% dan 12%. Perbedaan nilai antar perlakuan terapi dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Terapi topikal yang diberikan pada hewan coba mampu memberikan efek pada kadar MDA serum, yang berarti bahwa zat aktif pada salep ekstrak daun singkong seperti vitamin c dan flavonoid mampu masuk ke dalam pembuluh darah. Hal ini dapat dilihat dari hasil penelitian dimana terjadi perubahan kadar MDA serum pada **Tabel 5.1**. Menurut Raza *et al* (2015), obat topikal dapat masuk ke dalam pembuluh darah, namun harus melewati lapisan epidermis dan dermis. Pembuluh darah pada kulit terdapat mulai dari lapisan dermis hingga subkutan. Luka bakar derajat II melukai kulit hingga lapisan dermis, yang mana berarti bahwa terapi topikal yang diberikan tidak melewati lapisan epidermis, namun dapat langsung masuk ke lapisan dermis bawah dan subkutan yang banyak terdapat pembuluh darah. Hal ini menyebabkan zat aktif dari ekstrak daun singkong yang masuk ke dalam pembuluh darah lebih banyak, sehingga mampu berefek pada perubahan kadar MDA serum.

Berdasarkan hasil uji Tukey (**Tabel 5.1**), kadar MDA serum pada kelompok perlakuan 4% tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pada salep ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 4%

tidak cukup mampu menurunkan kadar MDA dalam tubuh. Jika dilihat dari nilai rata-rata kadar MDA pada kelompok perlakuan 4% menunjukkan bahwa terjadi sedikit penurunan jika dibandingkan dengan rata-rata kadar MDA pada kontrol positif, namun tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan bahan aktif pada salep tidak cukup mampu menurunkan kadar MDA yang terbentuk akibat perlakuan luka bakar. Hal ini dapat disebabkan oleh tidak cukupnya kandungan bahan aktif daun singkong yaitu vitamin C dan flavonoid pada salep untuk menurunkan kadar MDA.

Kadar MDA serum pada kelompok terapi 8% memiliki notasi yang sama dengan kontrol negatif (**Tabel 5.1**). Persamaan notasi ini menunjukkan bahwa pada perlakuan terapi pada kelompok terapi 8% dapat menurunkan kadar MDA hingga mendekati kadar MDA pada tikus normal atau kelompok kontrol negatif. Hal ini dapat terjadi karena adanya kandungan bahan aktif yang seimbang dalam ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) yang berperan pada proses kesembuhan luka. Bahan aktif yang terkandung dalam salep ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) yaitu flavonoid dan vitamin C yang berperan sebagai antioksidan mampu menurunkan reaktivitas dari ROS serta mencegah reaksi peroksidasi lipid, yang dapat dilihat dari penurunan kadar MDA serum. Flavonoid yang terdapat pada daun singkong adalah flavonoid golongan kuersetin. Kuersetin merupakan zat aktif kelas flavonoid kelompok flavonol yang memiliki aktivitas antioksidan kuat yang mampu mencegah terjadinya peroksidasi lemak. Aktivitas flavonoid dan vitamin C sebagai antioksidan adalah dengan menstabilkan aktivitas radikal bebas (Rosiana dkk, 2013, Warditiani dkk, 2015). Mekanisme kerja antioksidan adalah dengan

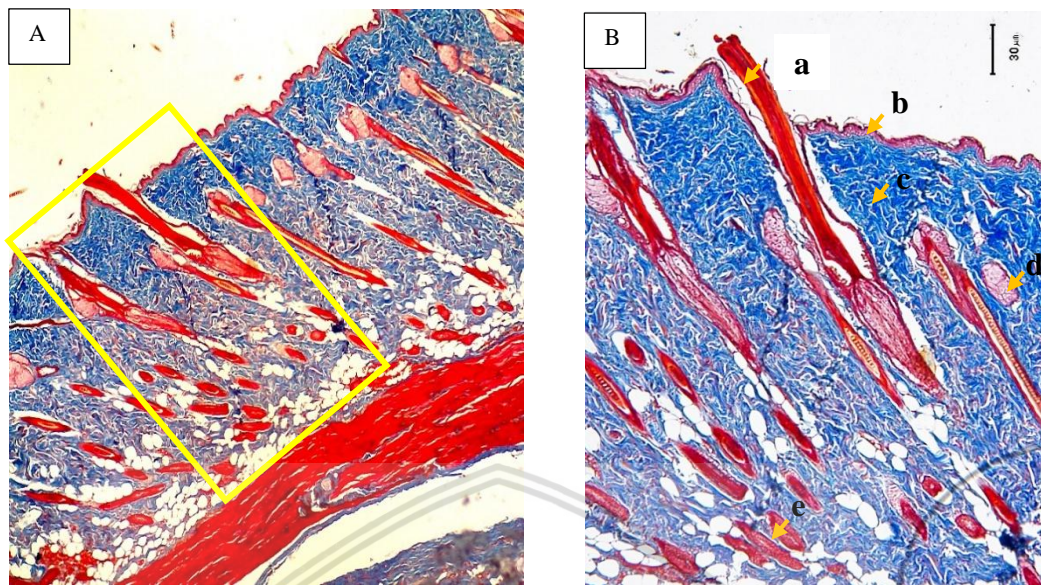
mendonasikan elektron ke radikal bebas yang dengan demikian dapat mengurangi reaktivitas dari radikal bebas tersebut (Labo dkk, 2010).

Berdasarkan hasil uji Tukey (**Tabel 5.1**), kadar MDA serum pada kelompok perlakuan 12% memiliki notasi yang berbeda dengan semua kelompok. Peningkatan kadar MDA pada kelompok perlakuan 12% dapat disebabkan oleh antioksidan yang lebih tinggi pada salep ekstrak daun singkong dapat berdampak negatif pada proses kesembuhan luka. Menurut Villanueva and Robert (2012), antioksidan tidak selalu berdampak positif dalam mencegah radikal bebas. Jika antioksidan sangat berlebihan dalam tubuh melebihi radikal bebas yang ada, maka antioksidan dapat menjadi radikal bebas. Hal ini dikarenakan antioksidan memiliki kecenderungan mendonasikan atau menangkap elektron dan saat tak mampu mendonasikan elektron atau menangkap elektron maka antioksidan menjadi reaktif dan bertindak sebagai radikal bebas. Meningkatnya kadar MDA dapat pula disebabkan oleh toksisitas flavonoid. Menurut Quartey *et al* (2016), kandungan flavonoid pada ekstrak etanol daun singkong adalah 131,34 mg/ gram. Menurut Tapas *et al* (2008), LD₅₀ flavonoid untuk tikus adalah 2-10 gram, sedangkan dosis yang dianjurkan untuk manusia adalah kurang dari 1 mg/hari/orang. Berdasarkan hasil penelitian oleh Mukinda (2005), mengenai toksisitas flavonoid dari ekstrak *Artemisia afra* yang diberikan pada tikus dengan dosis 2500 mg/kg telah mampu menyebabkan kematian 1-2 tikus dari total 3 ekor tikus. Kandungan flavonoid pada *Artemisia afra* adalah 0,1 µg/mg, nilai ini lebih rendah jika dibandingkan dengan kandungan flavonoid pada daun singkong. Selain itu, dapat pula didukung dari hasil penelitian Meilawaty (2013), dimana pada pemberian konsentrasi 12,5%

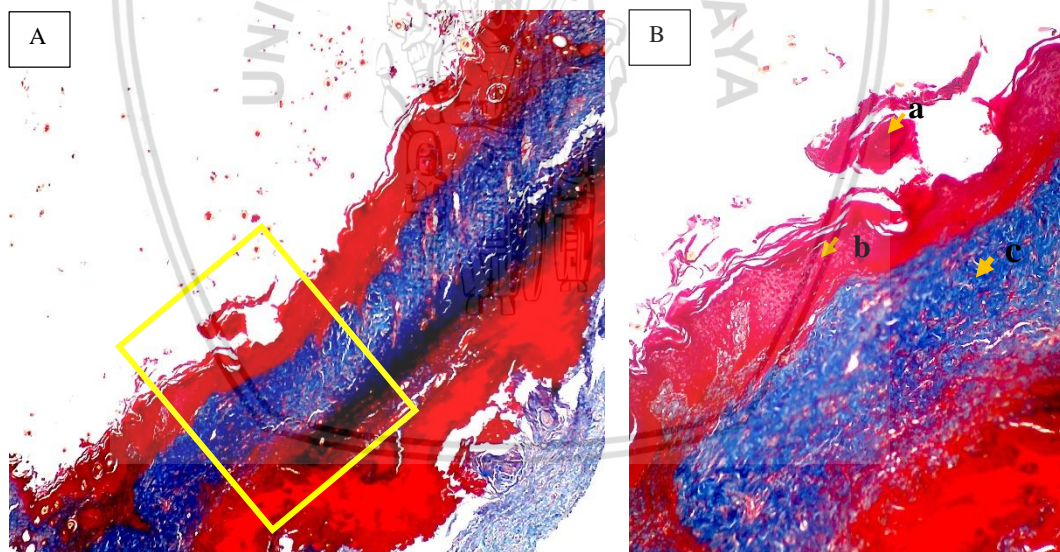
ekstrak daun singkong pada monosit yang diinduksi LPS tak mampu menurunkan ekspresi COX-2, yaitu enzim yang bertanggung jawab terhadap inflamasi.

5.3 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Singkong terhadap Gambaran Histopatologi Kolagen Kulit Hewan Tikus Model Luka Bakar Derajat II

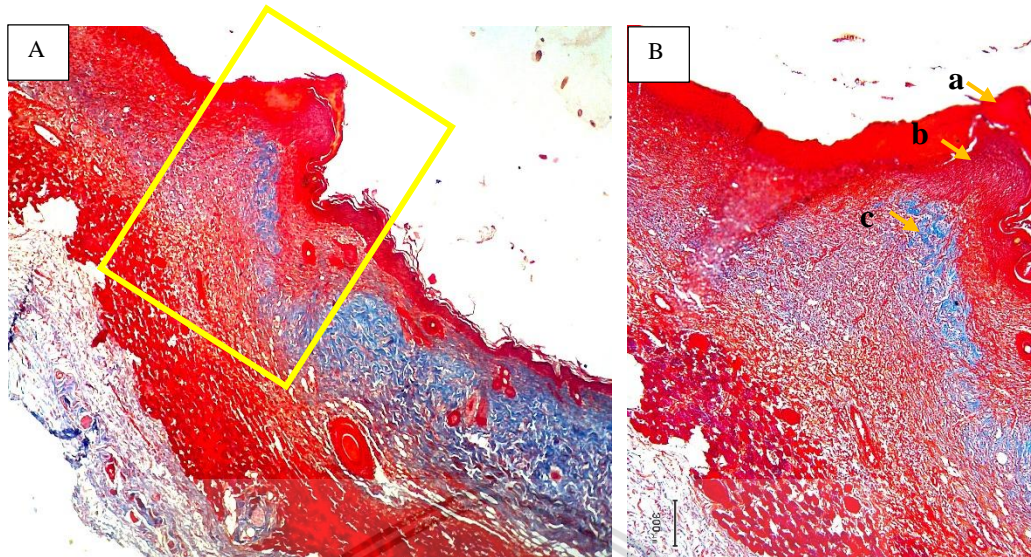
Pengamatan parameter histopatologi kulit dilakukan untuk mengetahui gambaran perbaikan kolagen pada tiap kelompok dan melihat apakah terdapat efek dari terapi salep ekstrak daun singkong terhadap histopatologi kolagen kulit tikus hewan model luka bakar derajat II. Kelompok tikus model luka bakar dibagi menjadi 4, dimana 1 kelompok merupakan kontrol positif yang tidak diberi perlakuan, sedangkan 3 kelompok lainnya diberi perlakuan terapi dengan salep ekstrak daun singkong bertingkat yaitu 4%, 8% dan 12%. Lama terapi adalah 14 hari dan pada hari ke 15 dilakukan eutanasi dan diambil organ kulit. Kulit tikus yang terkena luka bakar dibuat sediaan histopatologi dengan pewarnaan mallory, yang kemudian diamati dan dianalisis secara kualitatif deskriptif. Berikut adalah gambaran mikroskopik kulit pada tiap kelompok.



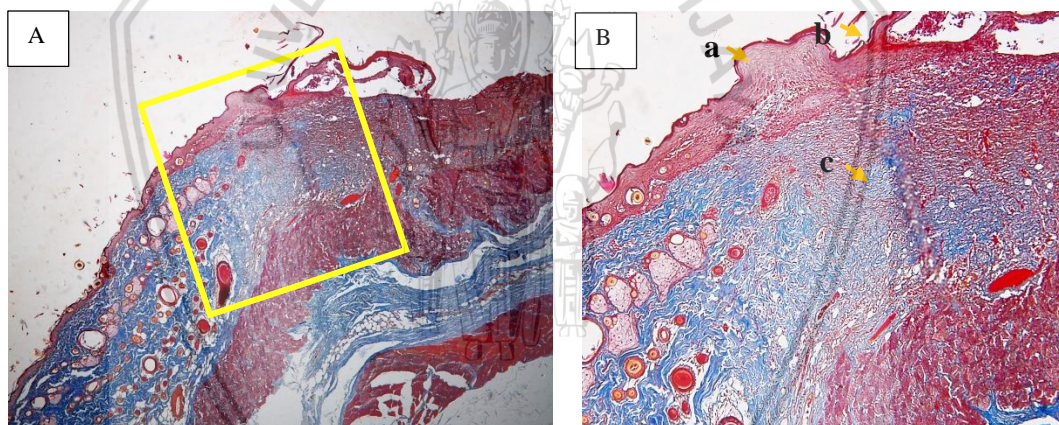
Gambar 5.3 Gambaran histopatologi kulit kontrol negatif, A. Perbesaran 40x; B. Perbesaran 100x menggunakan pewarnaan Mallory, a) folikel rambut, b) lapisan epidermis, c) kolagen, d) kelenjar sebacea, e) kelenjar keringat.



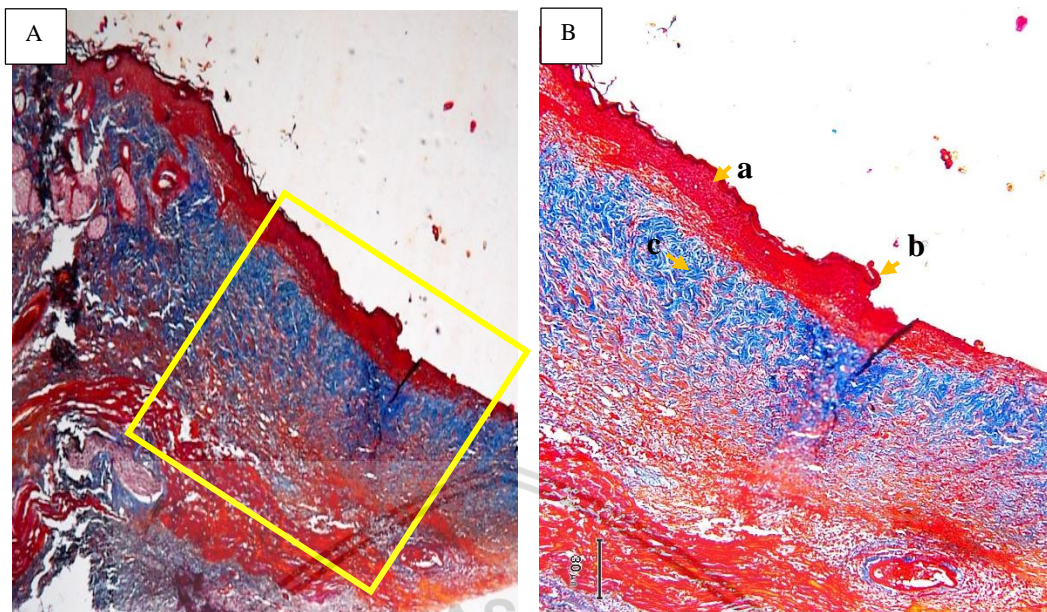
Gambar 5.4 Gambaran histopatologi kulit kelompok kontrol positif dengan perbesaran A.40x; B. 100x menggunakan pewarnaan Mallory, a) terbentuk keropeng atau eskar, b) epidermis mengalami hipertropi, c) kolagen telah terbentuk namun belum tebal



Gambar 5.5 Gambaran histopatologi kulit kelompok terapi 4% dengan perbesaran 40x dan 100x menggunakan pewarnaan Mallory, a) keropeng atau eskar masih tebal, b) hipertropi epidermis, c) kolagen terbentuk merata dan cukup tebal



Gambar 5.6 Gambaran histopatologi kulit kelompok terapi 8% dengan perbesaran A. 40x; B.100x menggunakan pewarnaan Mallory, a) hipertropi epidermis, b) keropeng atau eskar mulai terlepas, c) kolagen terbentuk lebih tebal dan merata



Gambar 5.7 Gambaran histopatologi kulit kelompok terapi 12% dengan perbesaran A. 40x ;B. 100x menggunakan pewarnaan Mallory, a) hipertropi epidermis menipis, b) keropeng atau eskar sangat tipis cenderung tidak ada, c) kolagen terbentuk merata dan tebal

Pewarnaan mallory merupakan pewarnaan khusus yang digunakan untuk melihat jaringan ikat serta kolagen. Pada pewarnaan mallory, nukleus sel akan terwarnai ungu; sitoplasma, keratin dan eritrosit akan terwarnai merah terang atau jingga; dan serabut kolagen terwarnai biru. Kolagen merupakan protein fibrosa (berserat) terbanyak dan memiliki fungsi untuk memberi kekuatan serta kelenturan dari kulit melalui jalinan serabut kolagen dengan keratin (Mescher, 2013).

Hasil penelitian mengenai pemberian salep ekstrak daun singkong sebagai terapi luka bakar derajat II terhadap pembentukan kolagen dengan pewarnaan mallory dianalisis secara kualitatif deskriptif menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x dan 100x dengan mengamati pembentukan kolagen (**Gambar 5.3** sampai dengan **Gambar 5.7**).

Gambaran histopatologi pada **Gambar 5.3** merupakan gambaran histologi kulit tikus sehat yang tidak diberikan luka bakar dan terapi salep ekstrak daun singkong. Terlihat tidak ada kerusakan yang terjadi pada struktur lapisan epidermis dan dermis kulit. Pengamatan yang dilakukan pada kontrol negatif dengan kontrol positif bertujuan untuk melihat perubahan pada struktur kolagen pada lapisan dermis setelah diberi luka bakar.

Kelompok kontrol positif (**Gambar 5.4**) menunjukkan adanya kerusakan pada lapisan epidermis dan dermis kulit dibandingkan dengan kontrol negatif. Terlihat pada **Gambar 5.4** bahwa terdapat keropeng atau eskar, epidermis kulit mengalami hipertropi yang disebabkan oleh proliferasi sel epitel, dan pada lapisan dermis terlihat kolagen telah terbentuk namun tidak setebal yang terlihat pada kontrol negatif dan tidak ditemukan adanya komponen kulit seperti folikel rambut dan kelenjar seperti yang terdapat pada kontrol negatif. Menurut Han *et al* (2005), keropeng atau eskar yang terbentuk pada area kulit luka bakar terbentuk atas fibrin dan platelet dari respon hemostasis serta infiltrasi sel mononuklear serja jaringan nekrotik.

Gambaran histopatologi kulit yang diberikan terapi salep ekstrak daun singkong dengan konsentrasi bertingkat yaitu 4%, 8% dan 12% menunjukkan adanya perubahan struktur yang terjadi pada lapisan epidermis dan dermis jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Hipertropi epidermis dapat terlihat pada semua kelompok terapi. Keropeng yang terdapat pada kelompok perlakuan terapi salep ekstrak daun singkong menunjukkan adanya perbedaan. Keropeng yang terdapat pada kelompok terapi 4% (**Gambar 5.5**) lebih tebal dibandingkan dengan

kelompok terapi 8% (**Gambar 5.6**). Gambaran keropeng pada kelompok terapi 8% dan 12% terlihat sangat tipis dan mulai mengalami pelepasan dari lapisan epidermis.

Menurut Mescher (2013), proses epitelisasi diawali dari migrasinya sel pada lapisan basal epidermis tepi luka ke bawah bekuan darah dari luka yang kemudian akan menjadi keropeng. Pembentukan sel epidermis dan fibroblast merupakan stimulus dari *growth factor* yang dilepaskan oleh makrofag. Proliferasi fibroblast dan pembentukan pembuluh darah baru kemudian akan menghasilkan terbentuknya kolagen baru dan vaskularisasi jaringan yang baik pada dermis, yang kemudian disebut sebagai jaringan granulasi. Jaringan granulasi ini kemudian akan menggantikan tempat bekuan darah atau keropeng. Pada tahapan akhir epidermis akan terus tumbuh namun kehilangan kemampuan untuk membentuk kelenjar dan folikel rambut yang baru. Untaian kolagen dan fibroblast pada jaringan ikat yang baru ini lebih banyak dan tak beraturan dibandingkan kulit normal, sehingga menghasilkan jaringan parut pada area luka.

Gambaran pembentukan kolagen kelompok terapi 4% (**Gambar 5.5**) terlihat lebih tebal dan merata dibandingkan kontrol positif. Hal ini dapat terlihat dari warna biru yang terlihat pada daerah dermis. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi salep ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 4% telah mampu meningkatkan sintesis kolagen pada area luka.

Gambaran pembentukan kolagen kelompok terapi 8% (**Gambar 5.6**) menunjukkan adanya peningkatan dibandingkan kelompok terapi 4% (**Gambar**

5.5). Hal ini disebabkan oleh konsentrasi bahan aktif yang terdapat pada obat sediaan salep 8% lebih tinggi dibandingkan salep 4%. Gambaran pembentukan kolagen pada kelompok terapi 12% (**Gambar 5.7**) terlihat lebih baik dibandingkan dengan kelompok terapi 4% dan 8%. Menurut hasil pengamatan gambaran histopatologi yang ada, menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi bahan aktif pada salep, semakin baik pula tingkat pembentukan kolagen pada area luka.

Menurut Harding (2011), kolagen merupakan molekul protein triple helix yang berperan penting dalam pembentukan jaringan ekstraseluler (ECM), bersamaan dengan komponen seluler, fibronectin, elastin, proteoglikan, laminin dan glikosaminoglikan. Adanya kolagen yang terbentuk pada area luka berfungsi dalam meningkatkan kekuatan regangan kulit, yang mana dapat mencapai 20% dari regangan kulit normal setelah 3 minggu post luka. Oleh sebab itu, pembentukan kolagen sangat penting dalam proses kesembuhan luka sehingga dapat mempercepat peningkatan kekuatan regangan dari kulit.

Ekstrak daun singkong memiliki kandungan saponin yang berperan dalam proses epitelisasi. Saponin dapat meningkatkan fibronectin, kemudian gumpalan fibrin yang terbentuk akan menjadi dasar dalam re-epitelisasi. Dengan demikian bila gumpalan fibrin cepat terbentuk, maka fibroblast akan segera berproliferasi ke area luka (Rosiana dkk, 2013).

Vitamin C yang terdapat pada ekstrak daun singkong sangat membantu proses sintesis kolagen. Pembentukan kolagen melalui proses hidroksilasi lisin menjadi hidroksilisin dan prolin menjadi hidroksiprolin. Proses hidroksilasi ini

memerlukan enzim *prolyl- α -hidroksilase* dan enzim *lisilhidroksilase* dalam bentuk aktif. Pengaktifan enzim *prolyl- α -hidroksilase* memerlukan katalisator berupa ion Fe^{2+} . Peran vitamin C adalah mengubah ion Fe^{3+} menjadi ion Fe^{2+} sehingga enzim *prolyl- α -hidroksilase* menjadi aktif. Sedangkan pengaktifan enzim *lisilhidroksilase* dibutuhkan katalisator ion Cu^{+} . Vitamin C berperan mengubah ion Cu^{2+} di dalam tubuh menjadi ion Cu^{+} . Flavonoid diketahui berperan melindungi asam askorbat (Vitamin C) dari oksidasi sehingga proses sintesis kolagen dapat berjalan dengan baik (Nisa dkk, 2013).

Basis salep *adeps lanae* juga mendukung perbaikan kulit. *Adeps lanae* memiliki kandungan air sebanyak 25-75% dan minyak yang dapat meningkatkan kerekatan salep pada kulit sehingga dapat melindungi kulit dari paparan zat asing dan mencegah evaporasi. Hal ini akan meningkatkan kelembaban yang mendukung proses kesembuhan luka dan perbaikan jaringan (Fajriansyah, 2016).

Berdasarkan hasil penelitian terdapat perbedaan konsentrasi salep optimum yang berefek pada kadar MDA serum dengan tingkat pembentukan kolagen. Konsentrasi optimum untuk kadar MDA serum adalah konsentrasi salep 8%, sedangkan pada tingkat pembentukan kolagen terjadi pada konsentrasi salep 12%. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh perbedaan fase dari kedua parameter. Menurut Jawad *et al* (2008), malondialdehid (MDA) banyak terbentuk pada fase inflamasi melalui aktivasi dari neutrofil, sedangkan pembentukan kolagen mulai terjadi pada fase akhir inflamasi atau awal fase proliferasi. Selain itu terdapat pula perbedaan zat aktif yang bekerja pada kedua parameter tersebut. Kadar MDA serum

dipengaruhi dari kadar antioksidan, yaitu vitamin c dan flavonoid, sedangkan pembentukan kolagen dibantu oleh vitamin c saja.

Konsentrasi salep ekstrak daun singkong 12% menunjukkan makin tingginya konsentrasi zat aktif seperti flavonoid dan vitamin c. Vitamin C yang makin tinggi berefek baik secara lokal karena membantu proses pembentukan kolagen. Menurut Montagnac *et al* (2009), kandungan vitamin c pada ekstrak etanol daun singkong adalah 60-370 mg/100 g atau 0,6-3,7 mg/g. Kandungan vitamin c ini dapat membantu proses hidroksilasi prolin dan lisin yang dibutuhkan dalam sintesis kolagen. Zat aktif pada salep ekstrak daun singkong akan berefek lokal terlebih dahulu kemudian dapat berefek sistemik setelah masuk ke pembuluh darah, sehingga kerja vitamin c lebih besar dalam membantu proses sintesis kolagen dibandingkan fungsinya sebagai antioksidan. Namun, pada konsentrasi 12% selain meningkatkan kadar zat aktif vitamin c, meningkatkan pula kadar flavonoid. Seperti yang telah di jelaskan sebelumnya, menurut Quartey *et al* (2016), kadar flavonoid pada ekstrak daun singkong cukup tinggi yaitu 131,34 mg/g dan fungsi dari flavonoid adalah sebagai antioksidan. Semakin tingginya kadar flavonoid ini berefek negatif terhadap kadar MDA karena dapat bersifat toksik, namun tidak berefek pada pembentukan kolagen karena flavonoid tidak berperan dalam proses sintesis kolagen.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini antara lain:

1. Salep ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dapat digunakan sebagai terapi luka bakar derajat II. Dalam penelitian ini, konsentrasi salep 8% adalah konsentrasi salep optimum untuk terapi luka bakar derajat II berdasarkan dari penurunan kadar MDA serum yang dibandingkan kontrol positif.
2. Salep ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dapat digunakan sebagai terapi luka bakar derajat II. Dalam penelitian ini, konsentrasi salep 12% merupakan konsentrasi optimum dalam membantu proses kesembuhan luka yang dapat dilihat dari tingkat pembentukan kolagen yang dibandingkan dengan kontrol positif

6.2 Saran

Saran yang dapat diajukan dalam penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengkaji toksisitas dari salep ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*), sehingga dapat digunakan sebagai pertimbangan dalam penentuan doses terapi yang lebih tepat pada kejadian luka bakar derajat II.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengkaji jenis sediaan obat topikal yang lebih tepat pada terapi luka bakar derajat II.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahliadi, S.S. 2014. Pengaruh Salep Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) terhadap Re-epitelisasi Epidermis pada Luka Bakar Tikus Sprague dawley [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- AlQahtani, S. M, Mohammad M.A.,Alberto C., Edward J.H. 2014. *Burn Management in Orthopedic Trauma*. Quebec McGill University Health Center.
- Arifin, H. 2012. Pengelolaan Infeksi pada Pasien Luka Bakar di Unit Perawatan Intensif. *Majalah Kedokteran Terapi Intensif*, 2(3) :160-164.
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. http://www.animaldiversity.org/accounts/Rattus_norvegicus [25 April 2017].
- Astuti. 2011. Determination of Saponin Compound from *Anredera codifolia* (Ten) Steenis Plant (Binahong) to Potential Treatment for Several Disease. *Journal of Agricultural Science*, 3(4): 224-232.
- Atik, B., Tan O.,Dulger H., Koseoglu B., Bekerecioglu M. 2004. The time course of serum malondialdehyde levels in burned humans. *Eurasian Genetik Medical*, 7(1): 26.
- Balqis, U., Rasmaidar dan Marwiyah. 2014. Gambaran Histopatologis Penyembuhan Luka Bakar menggunakan Daun Kedondong (*spondias dulcis f.*) dan Minyak Kelapa pada Tikus Putih (*rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterinaria*, 8(1) : 31-36.
- BBC Indonesia. 2015. Nasib pilu 14 orang utan yang diselamatkandari kebakaran hutan di Kalimantan. http://www.bbc.com/indonesia/majalah/2015/11/151102_trensosial_orangutan_kebakaranutan/ [28 April 2017].
- Dahlqvist, E., Andrew L, and Virve K. 2009. Conservative Treatment of a Scald in a Puppy. *Open Access Journal of Plastic Surgery*, 9: 427-433.
- Dewi, L.K. 2014. Kadar Total Senyawa Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air dan Ekstrak Metanol Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz.) [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institute Pertanian Bogor.
- Ermawati, E.F. 2010. Efek Antipiretik Ekstrak Daun Pare (*Momordica charantia* L.) pada Tikus Putih Jantan [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret.
- Fajriansyah, M.D. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrask Daun Binahong (*Anrebera cordifolia* (Tenore) Steenis) terhadap Kepadatan Kolagen pada Luka Bakar Derajat II [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Gurtner, G.C. 2007. Wound Healing: Normal and Abnormal. In Thorne, C.H., Beasley, R.W., Aston, S.J., Bartlett, S.P., Gurtner, G.C., and Spear, S.L.,

- Grabb and Smith's Plastic Surgery*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 15-22.
- Han, M.C., A.S. Durmus, E. Karabulut and I. Yaman. 2005. Effect of Turkish Propolis and Silver Sulfadiazine on Burn Wound Healing in Rats. *Revue Medic Veterinere*, 12: 624-627
- Harding, K., Aravindan R and David L. 2011. Role of collagen in wound management. *Wounds UK*, 7 (2): 54-63
- Harjana, T. 2011. *Buku Ajar Histologi*. Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- Hatta, R.D., Kuswan A.P., dan Dimas P.N. 2015. profil pasien kontraktur yang menjalani perawatan luka bakar di rsud arifin achmad periode januari 2011 – desember 2013. *JOM FK*, 2(2) : 1-5.
- Hidayat, T. S. N. 2013. Peran Topikal Ekstrak Gel Aloe Vera pada Penyembuhan Luka Bakar Derajat Dalam pada Tikus [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.
- Horton, J.W. 2003. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 189: 75-88
- Isrofah, S. dan Mohhammad A. 2015. Efektifitas Salep Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis) Terhadap Proses Penyembuhan Luka Bakar Derajat 2 Termal pada Tikus Putih (*Rattus Novergicus*). *Muhammadiyah Journal of Nursing*, 30.
- James, A.B. 1990. *Medical Science of Burning, First Edition*. Australia : Melbourne Unoversity Press.
- Jawad, F.H., Sahib A.S., and Kaisy A.A. 2008. Role of Antioxidant in the Treatment of Burn Lesion. *Animals of Burns and Fire Dsasters*, 21(4): 186
- Khazaeli, P., Mohammad K., and Shohreh R. 2014. Effects of Minoxidil Gel on Burn Wound Healing in Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (1): 243-251.
- Kuehnel, W. 2003. *Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy Edisi 4*.
- Kumar, S and Abhay K.P. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids : An Overview. *The ScientificWorld Journal*.
- Koch, M.A. 2006. Eksperimental Modeling and research Methodology. In Suckow, M.A., Weisbroth, S.H. and Franklin, C.L., *The Laboratory Rat (2nd ed.)*. Elsevier Inc. 587-625.
- Latifa, K.I. 2015. Profil Kadar MDA (*malondialdehyde*) pada Tikus yang diberikan Ekstrak Herba Thymi (*thymus vulgaris*) [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Ma'mun, N. 2013. Manfaat dan Kandungan Daun Singkong. <http://manfaatdankandungan.blogspot.com> [25 Juli 2017]

- Mardiani, T.H. 2008. Pengaruh Pemberian Timbal (Pb) terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) Plasma Mencit [Tesis]. Sekolah Pascasarjana Ilmu Biomedik. Universitas Sumatera Utara.
- Meilawaty, Z. 2013. Efek Ekstrak Daun Singkong (*Manihot utilissima*) terhadap Ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS E-coli. *Dental Journal*, 46(4): 196-201.
- Meiliana, R. dan Endang S. 2014. Pengaruh Proses Pengolahan Daun Singkong (*manihot esculenta crantz*) dengan Berbagai Perlakuan terhadap Kadar β -Karoten. *Indonesian Journal of Human Nutrition*, 1(1) : 23-34.
- Mescher, A.L.. 2013. Skin. In Mescher, A.L., *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas (13th ed.)*. McGraw-Hill Education. USA. 774-828.
- Moenadjat, Y. 2009. *Luka Bakar: Masalah dan Tata Laksana (Edisi 4)*. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. 90-110.
- Montagnac, J.A., Christopher R.D and Sherry A.T. 2009. Nutritional value of Cassava for Use as a Staple Food and Recent Advances for Improvement. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 8:181-192
- Morwal, S. 2016. Clinico-Therapeutic Management of First & Second Degree Burns in Cattle & Buffaloes. *International Journal of Veterinary Science*, 5(4) : 302-303.
- Mukinda, J.T. 2005. *Acute and Chronic toxicity of the flavonoid-containing plant, Artemisia afra in rodent*. Congo, University of the Western Cape.
- Mutia, C., Sri P.F dan Ratu C. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. *Prosiding Farmasi*, 3(1) :14-19.
- Negara, R.F.K., Retty R., dan Dina D. 2014. Pengaruh Perawatan Luka Bakar Derajat II menggunakan Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper betle* Linn.) terhadap Peningkatan Ketebalan Jarinan Granulasi pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar. *Majalah Kesehatan FKUB*, 1(2): 86-94.
- Nisa, V.M., Zahara M. dan Pudji A. 2013. Efek Pemberian Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) terhadap Proses Penyembuhan Luka Ginggiva Tikus (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Jember.
- Nielson, C.B., Nicholas C.D., James M.H., Mishael M., and John G.W. 2017. Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. *Journal of Burn Care and Research*, 38(1): 469-479
- Omar N.F., Siti A.H., Umi K.Y., Nur A.P.A., Puteri E.M.W and Uma R.S. 2012. Phenolics, Flavonoids, Antioxidant Activity and Cyanogenic Glycosides of Organic and Mineral-base Fertilized Cassava Tubers. *Molecules*, 17: 2378-2387
- Orsted, H.L., Keast, D., Lalande, L.F., and Megie, M.F. 2011. Basic Principles of Wound Healing. *Wound Care Canada*, 9(2):4-12.

- Prasetyono, T.O.H. 2009. General concept of wound healing, revisited. *Med J Indones*, 18(3) : 208-216
- Quartey, E.K., H.M. Amoatey, E.Achoribo, M.Owusu-Ansah, W.Nunekpeku, S.Donkor, A.S.Appiah, and E.S.Ofori. 2016. Phytochemical Constituents and Antioxidant Activities in Leaves of 14 Breeding Lines of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *American Journal of Experimental Agriculture*, 12(5):1-10.
- Rahayuningsih, T. 2012. Penatalaksanaan Luka Bakar (Combustio). *Profesi*, 8: 1-13.
- Rajan, V and Murray RZ. 2008. The duplicitous nature of inflammation in wound repair. *Wound Practice and Research*, 16(3) :122-129
- Raza, R.,Ashu M.,Puspendra K.,Sanjar A.,Surya P and Nitesh C. 2015. Approaches and evaluation of Transdermal drug delivery system. *International Journal Drug Development and Research*, 7(1):222-233
- Regan, M.C. and Barbul, A. 1994. The Cellular Biology of Wound Healing. In Schalag, G. and Redhl, H., *Wound Healing*. Springer Verlag. New York. 3-23.
- Rosiana, D.N., iin E.T., dan Erna S. 2013. Efek Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) terhadap Ketebalan Regenerasi Epitel Lesi Traumatik pada Mencit BALB/C Jantan. Fakultas Kedokteran Gigi. Jember: Universitas Jember.
- Santhi, D.G.D.D., Dewi, D.A.P.R., dan Subawa A.A.N. 2016. Perubahan Luas Area dan Pembentukan Jaringan Fibroblast pada Luka Bakar yang Diterapi dengan Madu dan Propolis. <http://erepo.unud.ac.id/id/eprint/2114> [21 September 2016].
- Shofia, V. 2013. Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum prismaticum*) terhadap Profil Malondialdehid dan Gambaran Histologis Gijal pada Tikus (*Rattus novergicus*) Diabetes Militus Tipe I [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Suprpti, M.L. 2005. *Tepung Tapioka: Pembuatan dan Pemanfaatannya*. Kanisius. Yogyakarta. 12
- Suvarna, M., Sivakumar and U.C.Niranjan. 2013. Classification Methods Of Skin Burn Images. *International Journal of Computer Science & Information Technology (IJCSIT)*, 5 (1) :109-118
- Tapas, A.R.,D.M. Sakarkar and R.B.Kakde. 2008. Flavonoids as Nutraceuticals:A Review. *Topical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3):1089-1099.
- Villanueva, C. and Robert D.K. 2012. Antioxidant-Induced Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 2091-2109
- Warditiani, N.K., Larasanty L.P.F dan Damanik I. 2015. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 70% Daun Singkong (Manihot utilissima Pohl) terhadap*

Kadar Gula Darah Mencit Jantan Galur Balb/C yang Diinduksi Aloksan.
Denpasar, Universitas Udayana.

- Wobeto, C., Correa, A.D., de Abreu C.M.P., dos Santos, C.D., and Pereira, H.V. 2007. Antinutrients in The Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Leaf Powder at Three Ages of The Plant. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1): 108-112.
- Yapa, K.S. and Enoch, S. 2009. Management of Burn in The Community. *Wounds UK*, 5(2): 38-48.
- Yildirim, S., Songul D., Abdulkadir Y., Osman E., Aydin., Akar K., and Esra L. 2012. Relationship of Serum Paraoxanase Enzyme Activity and Thermal Burn Injury. *Eurasian Journal Medical*, 44(3):153-156
- Yudaniayanti, I.S., Maulana, E., dan Ma'rufl A. 2010. Profil Penggunaan Kombinasi Ketamin-Xylazine dan Ketamin-Midazolam sebagai Anestesi Umum terhadap Gambaran Fisiologis Tubuh pada Kelinci Jantan. *Veterinaria Medika*, 3(1): 23-30.
- Yustika, A.R., Aulanni'am dan Sasangka P. 2013. Kadar Malondialdehid (MDA) dan Gambaran Histologi pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cylosporine-a. *Kimia Student Journal*, 1(2) : 222-228.
- Zang, Q., Maass D.L., White J., and Horton J.W. 2007. Cardiac mitochondrial damage and loss of ROS defense after burn injury: The beneficial effect of antioxidant therapy. *Journal Application Physiology*, 12:102-103.